



## **Središnja medicinska knjižnica**

**Krnić, Nevena (2014) *Kliničke, biokemijske i molekularne karakteristike bolesnika s neklasičnom kongenitalnom adrenalnom hiperplazijom zbog manjka 21-hidroksilaze [Clinical, biochemical and molecular characteristics of the patients with nonclassical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency]*. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.**

<http://medlib.mef.hr/2172>

University of Zagreb Medical School Repository

<http://medlib.mef.hr/>

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Nevena Krnić**

**Kliničke, biokemijske i molekularne  
karakteristike bolesnika s neklasičnom  
kongenitalnom adrenalnom hiperplazijom zbog  
manjka 21-hidroksilaze**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2014.**



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Nevena Krnić**

**Kliničke, biokemijske i molekularne  
karakteristike bolesnika s neklasičnom  
kongenitalnom adrenalnom hiperplazijom zbog  
manjka 21-hidroksilaze**

**DISERTACIJA**

**Zagreb, 2014.**

**UNIVERSITY OF ZAGREB  
SCHOOL OF MEDICINE**

**Nevena Krnić**

**Clinical, biochemical and molecular  
characteristics of the patients with  
nonclassical congenital adrenal hyperplasia  
due to 21-hydroxylase deficiency**

**DOCTORAL THESIS**

**Zagreb, 2014.**

Disertacija je izrađena u Zavodu za endokrinologiju i dijabetes Klinike za pedijatriju i Zavodu za tipizaciju tkiva Kliničkog zavoda za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju, Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

Voditelj rada: dr.sc. Miroslav Dumić, prof.emeritus

*Zahvaljujem se svom mentoru, dr.sc. Miroslavu Dumiću, prof. emeritusu, koji mi je otkrio svijet pedijatrijske endokrinologije i čija su nesebična pomoć, podrška i iskustvo bili neprocjenjivi u izradi ovog rada. Zahvaljujem se što je bio i ostao moj profesionalni uzor i stalni poticaj da nastojim biti bolja.*

*Zahvaljujem se prof.dr.sc. Zorani Grubić, prof.dr.sc. Vesni Kušec, dr.sc. Renati Žunec i dr.sc. Katarini Štingl na nesebičnoj pomoći oko laboratorijskog dijela istraživanja i vrijednim savjetima tijekom pisanja rada.*

*Zahvaljujem se liječnicama (mr.sc. Jasenki Ille, mr.sc. Nataši Rojnić Putarek i Aniti Špehar Uroić, dr.med.) i medicinskim sestrama Zavoda za endokrinologiju i dijabetes Klinike za pedijatriju (Biserki Štajnkler, bacc.med.techn. i Jasni Radanović, bacc.med.techn.) na pomoći, podršci i razumijevanju koje su mi pružali u svim fazama izrade rada.*

*Na kraju, zahvaljujem svojoj obitelji na ljubavi, strpljenju i podršci koju su mi pružali sve ove godine.*

*Rad posvećujem svojim roditeljima.*

# KAZALO

POPIS KRATICA.....	
1. UVOD.....	1
1.1. Sinteza i sekrecija hormona kore nadbubrežne žlijezde .....	1
1.1.1. Sinteza hormona kore nadbubrežne žlijezde u zdravih osoba .....	1
1.1.2. Sinteza hormona kore nadbubrežne žlijezde u oboljelih od KAH-e.....	2
1.2. Klinička slika klasičnih oblika KAH-e .....	4
1.3. Klinička slika neklasičnog oblika KAH-e .....	5
1.3.1. Incidencija NKKAH-e .....	5
1.3.2. Klinička slika NKKAH-e .....	6
1.3.3. Fertilitet u bolesnika s NKKAH-om .....	7
1.3.4. «Kriptični» oblik NKKAH-e .....	7
1.3.5. Učestalost NKKAH-e u različitim poremećajima .....	7
1.4. Biokemijski kriteriji za dijagnozu NKKAH-e .....	9
1.5. Genski poremećaj u bolesnika s KAH-om.....	12
1.5.1. Gen CYP21A2 .....	12
1.5.2. Mutacije gena CYP21A2.....	13
1.5.3. Povezanost mutacija gena CYP21A2 i sustava HLA .....	16
1.5.4. Korelacija genotipa i fenotipa.....	16
1.5.5. Rizik za rađanje djeteta s klasičnim ili neklasičnim oblikom kongenitalne adrenalne hiperplazije. Potreba prenatalne dijagnostike i terapije.....	17
1.6. Dosadašnje spoznaje o NKKAH-i u Hrvatskoj.....	19
1.7. Heterozigoti.....	21
2. HIPOTEZA I CILJEVI RADA .....	22
2.1. Hipoteza .....	22
2.2. Ciljevi rada .....	23
3. ISPITANICI I METODE.....	24
3.1. Ispitanici.....	24
3.2. Metode istraživanja.....	24
3.2.1. Anamnestički podaci i klinički pregled.....	25
3.2.2. Laboratorijski testovi .....	27
3.2.3. Analiza mutacija gena CYP21A2 .....	28
3.2.4. Tipizacija antigena/gena HLA razreda I i II.....	29
3.2.5. Statistička obrada prikupljenih podataka .....	29
4. REZULTATI.....	31
4.1. Kliničke osobine bolesnika s NKKAH-om.....	31

4.1.1.	Klinički simptomi bolesnika s NKKAH-om prilikom postavljanja dijagnoze i njihova distribucija (N=31).....	33
4.1.2.	Klinički simptomi bolesnika s NKKAH-om prilikom postavljanja dijagnoze i njihova distribucija (N= 18).....	36
4.1.3.	Tjelesna visina i koštana zrelost u bolesnika s NKKAH prije puberteta .....	38
4.1.4.	Utjecaj spola na prisutnost simptoma hiperandrogenizma .....	40
4.1.5.	Fertilitet u bolesnika s NKKAH-om .....	45
4.2.	Biokemijske osobine bolesnika s NKKAH-om, tipizacija HLA i analiza mutacija gena <i>CYP21A2</i> .....	48
4.2.1.	Biokemijske osobine bolesnika s NKKAH-om.....	48
4.2.2.	Određivanje antigena/gena HLA-A,-B i -DR i analiza mutacija gena <i>CYP21A2</i> u bolesnika s NKKAH-om.....	55
4.2.3.	Odnos genotipa i fenotipa.....	65
4.3.	Analiza članova obitelji bolesnika s NKKAH-om .....	67
4.4.	Razlike koncentracija 17-OHP bazalno i nakon stimulacije s ACTH između bolesnika s NKKAH-om, heterozigota i zdravih homozigota. Analiza osjetljivosti i specifičnosti izmjerenih koncentracija 17-OHP bazalno i nakon stimulacije s ACTH kod bolesnika s NKKAH-om i zdravih ispitanika .....	77
4.4.1.	Razlike koncentracija 17-OHP bazalno i nakon stimulacije s ACTH između bolesnika s NKKAH-om, heterozigota i zdravih homozigota .....	77
4.4.2.	Analiza osjetljivosti i specifičnosti izmjerenih koncentracija 17-OHP bazalno i nakon stimulacije s ACTH kod bolesnika s NKKAH-om i zdravih ispitanika – ROC analiza (engl. «Receiver Operating Characteristic Curve») .....	82
5.	RASPRAVA .....	87
5.1.	Kliničke osobine bolesnika s NKAH-om i heterozigota .....	88
5.2.	Biokemijske osobine bolesnika s NKKAH-om i heterozigota.....	92
5.3.	Rezultati analize gena HLA i mutacija gena <i>CYP21A2</i> u bolesnika s NKKAH-om i heterozigota.....	96
5.4.	Kliničke i biokemijske značajke bolesnika s NKKAH-om i heterozigota u ovisnosti o vrsti mutacije gena <i>CYP21A2</i> .....	100
5.5.	Fertilitet u bolesnika s NKKAH-om. Potreba prenatalne dijagnostike. ....	103
6.	ZAKLJUČCI.....	106
7.	SAŽETAK .....	109
8.	SUMMARY .....	110
9.	POPIS LITERATURE.....	111
10.	ŽIVOTOPIS .....	127



## POPIS KRATICA

KAH – kongenitalna adrenalna hiperplazija

NKKAH – nekласični oblik kongenitalne adrenalne hiperplazije

21-OH – 21- hidroksilaza

17-OHP – 17-hidroksiprogesteron

ACTH – adrenokortikotropni hormon

c-AMP – ciklički adnozin-monofosfat

engl. – engleski

SWKAH – kongenitalna adrenalna hiperplazija s gubitkom soli (od engl. «*salt wasting*»)

SVKAH – jednostavna virilizirajuća forma kongenitalne adrenalne hiperplazije (od engl. «*simple virilizing*»)

PCOS – sindrom policističnih jajnika (od engl. «*polycystic ovary syndrome*»)

TART – ektopično adrenalno tkivo u testisima (od engl. «*testicular adrenal rest tissue*»)

HLA – Humani Leukocitni Antigeni

hCG- humani korionski gonadotropin

SDS – odstupanje u odnosu na srednju vrijednost (od engl. «*standard deviation score*»)

DNA – deoksiribonukleinska kiselina (od engl. «*deoxyribonucleic acid*»)

EDTA – etilendiamintetraoctena kiselina (od engl. «*ethylenediamintetraacetic acid*»)

PCR – lančana reakcija polimerazom (od engl. «*polymerase chain reaction*»)

PCR-SSP – lančana reakcija polimerazom uz primjenu početnica specifičnih za određeni slijed (od engl. «*polymerase chain reaction sequence specific primers*»)

ROC – analiza osjetljivosti i specifičnosti testa (od engl. «*Receiver Operating Characteristic Curve*»)

N – broj ispitanika

NP – nije poznato

Ž – ženski spol

M – muški spol

FGS – stupnjevi po Ferriman-Gallway-u (od engl. «*Ferriman-Gallway score*»)

SD – standardna devijacija

Min – najniža vrijednosti

Max – najviša vrijednost

$\Delta 4$  – androstendion

T – testosteron

NT – nije testirano

Ex – egzon

Int – intron

CI – interval pouzdanosti (od engl. «*confidence interval*»)

M – majka

O – otac

S – sestra

B – brat

D – dijete

# 1. UVOD

Kongenitalna adrenalna hiperplazija (KAH) je skupina nasljednih autosomno-recesivnih bolesti u kojih je poremećena sinteza kortizola u kori nadbubrežnih žlijezda.

Prvi opis ove bolesti potječe iz 1865. godine (de Crecchio), no tek je u drugoj polovici 20. stoljeća, otkrićem poremećene sinteze kortizola kao uzroka bolesti i autosomno-recesivnog načina prijenosa bolesti uslijedilo bolje razumijevanje prirode KAH-e (1). Otkriće gena *CYP21A2* koji kodira enzim 21-hidroksilazu 1986. godine otvorilo je novo poglavlje u istraživanju KAH-e (2). Prvi opis bolesnice s neklasičnim oblikom bolesti dali su Decourt i sur. 1957. godine (3), 1979. godine neklasični oblik prepoznat je kao zaseban, najblaži oblik KAH-e (4), a desetak godina kasnije otkrivene su i mutacije gena *CYP21A2* koje uzrokuju ovaj oblik bolesti (5, 6, 7).

## 1.1. Sinteza i sekrecija hormona kore nadbubrežne žlijezde

U kori nadbubrežnih žlijezda sintetiziraju se tri skupine hormona: glukokortikoidi (čiji je krajnji proizvod kortizol), mineralokortikoidi (čiji je krajnji proizvod aldosteron) i spolni hormoni (u prvom redu androgeni i tek u manjoj mjeri estrogeni).

### 1.1.1. Sinteza hormona kore nadbubrežne žlijezde u zdravih osoba

Sinteza hormona kore nadbubrežne žlijezde složen je proces koji se odvija kroz nekoliko enzimskih stupnjeva (Slika 1.1). Prvi stupanj u sintezi čini pretvorba kolesterola u pregnenolon (enzim 20,22-dezmolaza, koju kodira gen *CYP11A1*), koji je zajednička preteča za sintezu glukokortikoida, mineralokortikoida i spolnih hormona. Prvih nekoliko enzimskih reakcija zajedničke su za sintezu mineralokortikoida i glukokortikoida. Pregnenolon se

djelovanjem enzima 3 $\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenaze, koju kodira gen *HSD3B2*, pretvara u progesteron, koji se potom hidroksilira na poziciji C21 u deoksikortikosteron djelovanjem enzima 21-hidroksilaze (21-OH), čiju sintezu regulira gen *CYP21A2*. Deoksikortikosteron se hidroksilira na poziciji C11 čime nastaje kortikosteron, koji se potom hidroksilira i oksidira na poziciji C18, što rezultira sintezom aldosterona. 11 $\beta$ -hidroksilaciju, 18-hidroksilaciju i 11-oksidaciju vrši isti enzim čiju sintezu kodira gen *CYP11B2*.

U sintezi glukokortikoida, pregnenolon se djelovanjem enzima 17 $\alpha$ -hidroksilaze/17,20-liaze (gen *CYP17A1*) pretvara u 17 $\alpha$ -hidroksipregnenolon, koji se potom djelovanjem 3 $\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenaze pretvara u 17 $\alpha$ -hidroksiprogesteron. Hidroksilacijom na poziciji C21, djelovanjem enzima 21-OH, nastaje 11-deoksikortizol, čijom se hidroksilacijom na poziciji C11 djelovanjem enzima 11 $\beta$ -hidroksilaze (gen *CYP11B1*) stvara kortizol.

Sinteza spolnih hormona u kori nadbubrežne žlijezde odvija se pretvorbom 17-hidroksipregnenolona u dehidroepiandrosteron djelovanjem enzima 17 $\alpha$ -hidroksilaze/17,20-liaze, koji se potom djelovanjem enzima 3 $\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenaze pretvara u androstendion. Daljnja sinteza spolnih hormona odvija se u gonadama; androstendion se pretvara u testosteron djelovanjem 17 $\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenaze i u estron djelovanjem aromataze (*CYP19A*).

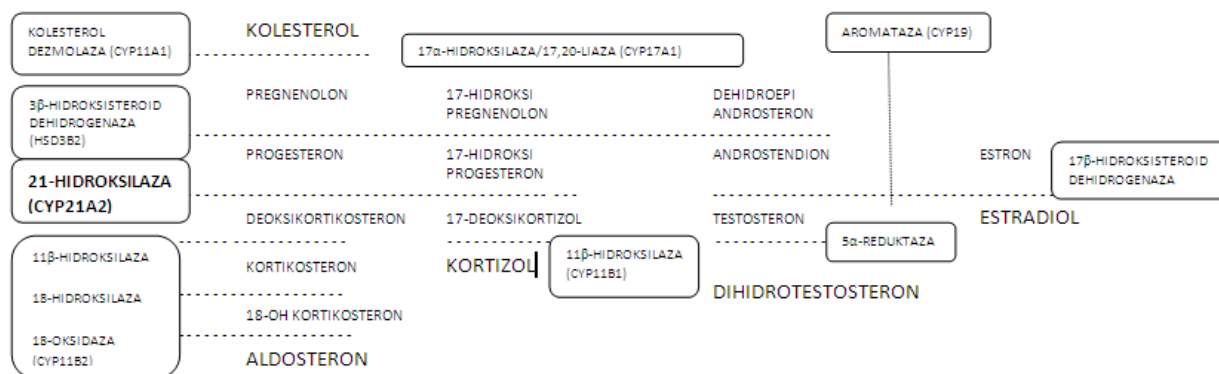
### ***1.1.2. Sinteza hormona kore nadbubrežne žlijezde u oboljelih od KAH-e***

U bolesnika s KAH-om poremećaj može zahvatiti bilo koji od enzima koji sudjeluju u steroidogenezi. U više od 95% bolesnika radi se o poremećaju funkcije enzima 21-OH.

Smanjena funkcija enzima 21-OH dovodi do pojačanog stvaranja preteča koji se nalaze neposredno ispred enzimskog bloka. Povišena koncentracija 17-hidroksiprogesterona (17-OHP) dijagnostički je najvažniji biokemijski poremećaj u bolesnika s KAH-om zbog manjka 21-OH. Nedostatak enzima 21-OH dovodi do smanjene sinteze kortizola, koji potom mehanizmom negativne povratne sprege dovodi do povećane sekrecije adrenokortikotropnog hormona (ACTH) iz hipofize. ACTH se veže na G-protein vezani receptor na stanicama kore nadbubrežnih žlijezda, čijom se aktivacijom povećava unutarstanična koncentracija cAMP-a (ciklički adenozin-monofosfat). cAMP ima dvojaki učinak na pojačanu funkciju kore

nadbubrežne žlijezde: kratkoročno povećava transport kolesterola u mitohondrije, a dugotrajniji učinak očituje se djelovanjem na transkripcijske gene koji kodiraju enzime koji sudjeluju u steroidogenezi. ACTH također utječe na preuzimanje kolesterola iz lipoproteina plazme, te uzrokuje hiperplaziju kore nadbubrežnih žlijezda. Aldosteron se sintetizira u 100 do 1000 puta manjim koncentracijama od kortizola, a njegova je sinteza ovisna o koncentracijama kalija i regulirana u okviru sustava renin-angiotenzin-aldosteron.

Poremećena funkcija enzima 21-OH dovodi s jedne strane do pojačane sekrecije adrenalnih steroida u čijoj sintezi ne sudjeluje ovaj enzim, a s druge strane do nagomilavanja hormonskih preteča čija daljnja pretvorba zbog poremećene funkcije enzima nije moguća, u prvom redu 17-OHP. Čini se da postoje i alternativni metabolički putevi kojima se 17-OHP pretvara u  $5\alpha$ -pregnan- $3\alpha,17\alpha$ -diol-20-on, koji se djelovanjem 17,20-liaze pretvara u androsteron, zaobilazeći klasični metabolički put konverzije preko androstendiona i testosterona (8). U bolesnika s KAH-om zbog manjka 21-OH, ovisno o stupnju oštećenja enzimske funkcije, dolazi do smanjene sekrecije kortizola i aldosterona i/ili prekomjernog stvaranja adrenalnih androgena, o čemu ovisi i klinička slika bolesti (9, 10, 11).



Slika 1.1 Shema steroidogeneze. S lijeva na desno prikazana je shema sinteze mineralokortikoida, glukokortikoida, androgena i estrogena s krajim proizvodima: aldosteronom, kortizolom, dihidrotestosteronom i estradiolom, te pripadajućim enzimima koji kataliziraju odgovarajuće enzimske reakcije tijekom sinteze.

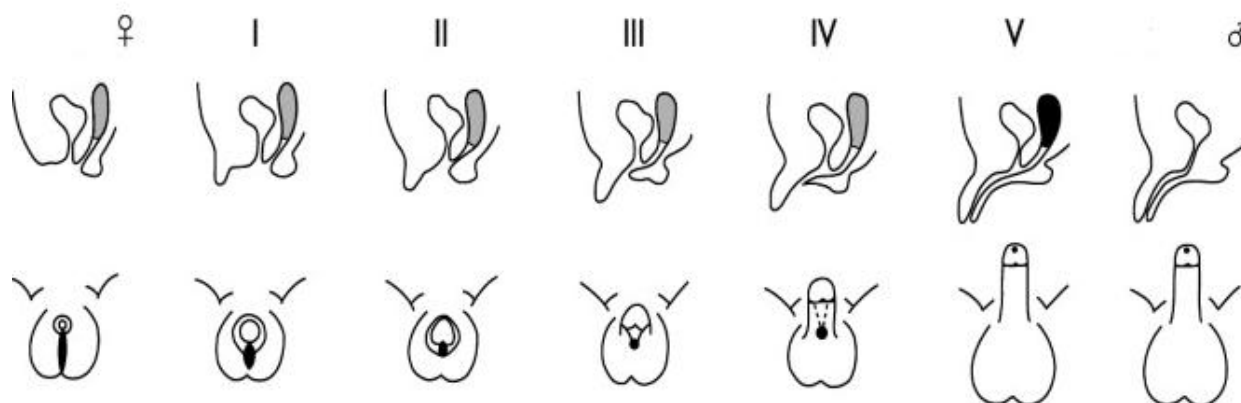
## 1.2. Klinička slika klasičnih oblika KAH-e

Prema kliničkoj slici razlikuju se tri oblika KAH-e: 1. gubioci soli (engl. «*salt wasting*», SWKAH), 2. jednostavna virilizirajuća forma (engl. «*simple virilising*», SVKAH) i 3. neklasični oblik (engl. «*nonclassic CAH*», NKKAH). «Gubioci soli» i «jednostavna virilizirajuća forma» svrstavaju se u klasične oblike bolesti (10, 12, 13).

Tri četvrtine bolesnika s klasičnim oblikom KAH-e ima potpuni nedostatak enzima 21-OH, što uzrokuje manjak aldosterona i kortizola. Nedostatak aldosterona dovodi do gubitka natrija putem bubrega, crijeva i žlijezda znojnice, a nedostatak kortizola potencira metabolički disbalans, te se u ovih bolesnika, bez uvođenja supstitucijske terapije, u prvim tjednima života razvijaju simptomi adrenalne krize: nedostatak apetita, povraćanje, letargija, nenapredovanje na težini, hiponatremija, hiperkalemija, metabolička acidoza, dehidracija i hipovolemijski šok.

U bolesnika s jednostavnim virilizirajućim oblikom bolesti (oko  $\frac{1}{4}$  bolesnika s klasičnim oblikom KAH-e) radi se o djelomičnom nedostatku enzima 21-OH, što uzrokuje smanjenu sintezu kortizola, te prekomjernu sintezu prekursora prije enzimskog bloka i adrenalnih androgena, ali uz očuvanu sintezu aldosterona, te u ovih bolesnika ne dolazi do razvoja adrenalne krize.

Prekomjerna sinteza 17-OHP preusmjerava se u sintetski put u kojem se stvaraju adrenalni androgeni, te već intrauterino u djevojčica s klasičnim oblikom bolesti dolazi do virilizacije vanjskog genitala: hipertrofije klitorisa, fuzije labija i rostralne migracije otvora uretre i vagine s formiranjem urogenitalnog sinusa i jednog zajedničkog otvora koji se može nalaziti na perineumu, korijenu ili vrhu peniformnog klitorisa. Stupanj virilizacije genitala izražava se stupnjevima po Praderu (14), pri čemu I. stupanj označava najblaži stupanj virilizacije s klitoromegalijom, bez fuzije labija, a stupanj V. odgovara potpuno viriliziranom genitalu s peniformnim klitorisom, otvorom uretre na vrhu klitorisa i fuzijom labija koje izgledaju poput skrotuma (slika 1.2). Dječaci sa SW oblikom KAH-e po porodu nemaju klinički vidljivih znakova bolesti, te se nerijetko u njih dijagnoza postavlja tek nakon razvoja adrenalne krize.



Slika 1.2 Stupnjevi virilizacije ženskog vanjskog genitala prema Praderu

Prekomjerna sinteza adrenalnih androgena u neadekvatno liječenih dječaka i djevojčica s klasičnim oblikom KAH-e dovodi do progresivnog povećanja genitala u dječaka (penisa, bez istovremenog povećanja volumena testisa), odnosno progresivne virilizacije vanjskog genitala u djevojčica, preuranjenog razvoja pubične i aksilarne dlakavosti, stvaranja akni, te ubrzanog rasta praćenog ubrzanim koštanim dozrijevanjem. Nakon puberteta, osobito u loše reguliranih bolesnica, mogu se javiti poremećaji menstruacijskog ciklusa, primarna ili sekundarna amenoreja, hirzutizam, akne i sindrom policističnih jajnika (PCOS; od engl. «*polycystic ovary syndrome*»), dok se u muških bolesnika mogu javiti akne i temporalna alopecija. Fertilitet u bolesnica s klasičnim oblikom bolesti je smanjen, osobito u onih sa SW oblikom bolesti, a u neadekvatno liječenih muških bolesnika fertilitet je također smanjen i postoji sklonost nastanku tumora u testisima (TART; engl. «*testicular adrenal rest tissue*»).

### 1.3. Klinička slika neklasičnog oblika KAH-e

#### 1.3.1. Incidencija NKKAH-e

Incidencija NKKAH-e u općoj populaciji procjenjuje se na oko 0,1% - 1% (1/53 u Latino Amerikanaca, 1/333 u Talijana, 1/1000 u Anglosaksonaca) (15, 16, 17). Najveća je učestalost opisana među Aškenazi Židovima (učestalost bolesti 1:27, učestalost heterozigota 1/3) (17).

### **1.3.2. Klinička slika NKKAH-e**

NKKAH-a predstavlja najblaži oblik manjka 21-hidroksilaze, u kojem je očuvano 20-60% funkcije enzima 21-OH. Kortizol i aldosteron se u ovih bolesnika stvaraju u normalnim količinama, ali na račun prekomjerne sinteze adrenalnih androgena. Klinička slika stoga nije rezultat nedostatka kortizola i aldosterona, već hipersekrecije androgena, zbog čega se bolest češće otkriva u ženskih bolesnica, osobito u adolescenciji i odrasloj dobi (18). Vanjsko spolovilo u novorođene ženske djece normalno je diferencirano (u nekih može biti prisutna klitoromegalija), a bolest se u djetinjstvu u oba spola može očitovati pojavom nepotpunog oblika lažnog preuranjenog puberteta (prematurne pubarhe ili prematurne adrenarhe koje se razvijaju prije 8. godine u djevojčica ili prije 9. godine u dječaka; povećanje penisa u dječaka bez istovremenog povećanja volumena testisa), uz ubrzani rast i ubrzano koštano dozrijevanje. U multicentričnoj studiji koju su proveli Moran i sur. (19) na 220 bolesnika s NKKAH-om, prematurne adrenarhe u anamnezi imalo je 92% bolesnika u kojih je dijagnoza postavljena prije 10. godine života, 8% bolesnika koji su otkriveni između 10 i 19. godine, te 4% bolesnika u kojih je bolest otkrivena između 20 i 29. godine života. Ubrzano koštano dozrijevanje nerijetko je jače izraženo nego ubrzanje rasta, te djeca s NKKAH-om ne moraju znatnije odstupati visinom u odnosu na vršnjake (20). Iako su ovi bolesnici u djetinjstvu viši u odnosu na vršnjake, zbog preuranjenog spolnog dozrijevanja konačno dosegnuta visina može biti manja od očekivane obzirom na genetski potencijal (21, 22). U djevojaka i odraslih žena mogu se javiti hirsutizam, cistične akne, poremećaji menstruacijskog ciklusa (oligomenoreja, amenoreja, anovulacijski ciklusi, sindrom policističnih jajnika), neplodnost i androgena alopecija. Učestalost hirsutizma i androgene alopecije povećava se s dobi ispitanica (18).

Većina muškaraca s NKKAH-om otkrivenom nakon puberteta nema nikakvih simptoma, a rjeđe se mogu prezentirati cističnim aknama, oligospermijom, infertilitetom ili smanjenim rastom (17, 23, 24, 25). Ovi bolesnici uglavnom su otkriveni analizom članova obitelji u kojima je prethodno nađen bolesnik s klasičnim ili neklasičnim oblikom KAH-e. Osim hipersekrecijom androgena, bolesnici s NKKAH-om mogu se prezentirati u 60-tim godinama života i adrenokortikalnim incidentalomima (26, 27, 28, 29).



### **1.3.3. Fertilitet u bolesnika s NKKAH-om**

Iako učestalost spontanih trudnoća u žena s NKKAH-om može biti smanjena (9), uz primjenu adekvatne terapije (a ponekad i bez nje) fertilitet je uglavnom zadovoljavajući (30, 31, 32, 33, 34, 35). Bolesnice mogu imati veću učestalost spontanih pobačaja, ali uz primjenu terapije hidrokortizonom učestalost je bitno manja (23,6% bez terapije; 6,5% uz primjenu terapije) (36). Funkcija gonada značajno je manje poremećena u muškaraca koji boluju od NKKAH-e, pa je većina muškaraca plodna. Oligospermija, koja se može naći u nekih bolesnika, izgleda da nema značajnijeg utjecaja na njihov fertilitet (23, 37). Ektopično adrenalno tkivo u testisima (engl. «*testicular adrenal rest tissue*»; TART), koje se često nađe u bolesnika s klasičnim oblikom KAH-e i očituje se kao benigna tumorska tvorba u testisima, u bolesnika s NKKAH-om izuzetno je rijetka i do sada je opisana samo u jednog bolesnika (38).

### **1.3.4. «Kriptični» oblik NKKAH-e**

Ne samo muškarci, već i dio žena s NKKAH-om mogu biti bez ikakvih simptoma unatoč povišenim razinama androgena («asimptomatski» ili «kriptični» oblik bolesti) (39, 40, 41). Ovi se bolesnici uglavnom otkriju ispitivanjem članova obitelji u kojoj se rodilo dijete s klasičnim ili neklasičnim oblikom KAH-e. Nije poznato zbog čega neki bolesnici imaju simptome uzrokovane hipersekrecijom androgena, a drugi su asimptomatski, unatoč istim koncentracijama hormona i istom genotipu. Smatra se, međutim, da najveći broj bolesnika u kojih se postavi dijagnoza NKKAH-e u nekom životnom razdoblju razvije jedan ili više simptoma koji su posljedica prekomjerne sekrecije androgena (17).

### **1.3.5. Učestalost NKKAH-e u različitim poremećajima**

Podaci o učestalosti NKKAH-e u žena s hirsutizmom su različiti, i kreću se u rasponu od 1,6% do 33%, ovisno o etničkoj pripadnosti i kriterijima izbora ispitanika (prisutnost ili odsutnost drugih znakova hipersekrecije androgena) (Tablica 1. 1), iako se čini da je u većini studija s većim brojem ispitanika učestalost manja od 5% (42).

Tablica 1.1. Učestalost nekласične kongenitalne adrenalne hiperplazije u žena s hirsutizmom u različitim populacijama.

Država	Učestalost (%)	NKKAH-e	Referenca
<b>Francuska</b>	6,0		(43)
<b>SAD</b>	2,2		(44)
<b>Poljska</b>	21,4		(45)
<b>Španjolska</b>	4,5		(46)
<b>Turska</b>	3,0		(47)
<b>SAD</b>	1,6		(48)
<b>Turska</b>	33,0		(49)
<b>Španjolska</b>	2,2		(50)
<b>Italija</b>	4,3		(51)
<b>Grčka</b>	10,0		(52)

U žena s NKKAH-om akne su obično samo jedan od simptoma androgene hipersekrecije, a vrlo su rijetko i jedini vidljivi znak. Na NKKAH-u svakako treba posumnjati u žena koje imaju perzistentne akne u odrasloj dobi (53). Među bolesnicama s aknama češće se nađu heterozigoti, odnosno nosioci jedne mutacije na genu *CYP21A2* (54, 55, 56, 57). Međutim, u muških bolesnika s NKKAH-om jedini uočljivi simptom hipersekrecije androgena mogu biti akne (58, 59, 60) ili androgena alopecija (61, 62).

Učestalost NKKAH-e i u djece s prematurnim pubarhama (preuranjena pojava pubične dlakavosti) i prematurnim adrenarhama (preuranjena pojava simptoma sekrecije adrenalnih androgena) razlikuje se u pojedinim studijama, i kreće u rasponu od 3,8 – 36% (Tablica 1.2.). S druge strane, u dvije studije s relativno malim brojem ispitanika, niti jedno dijete s prematurnim adrenarhama nije zadovoljilo biokemijske kriterije za NKKAH (0/15 bolesnika (63); 0/31 bolesnika (64)).

Tablica 1.2. Učestalost neklasične kongenitalne adrenalne hiperplazije u djece s prematurnim pubarhama i prematurnim adrenarhama u različitim populacijama

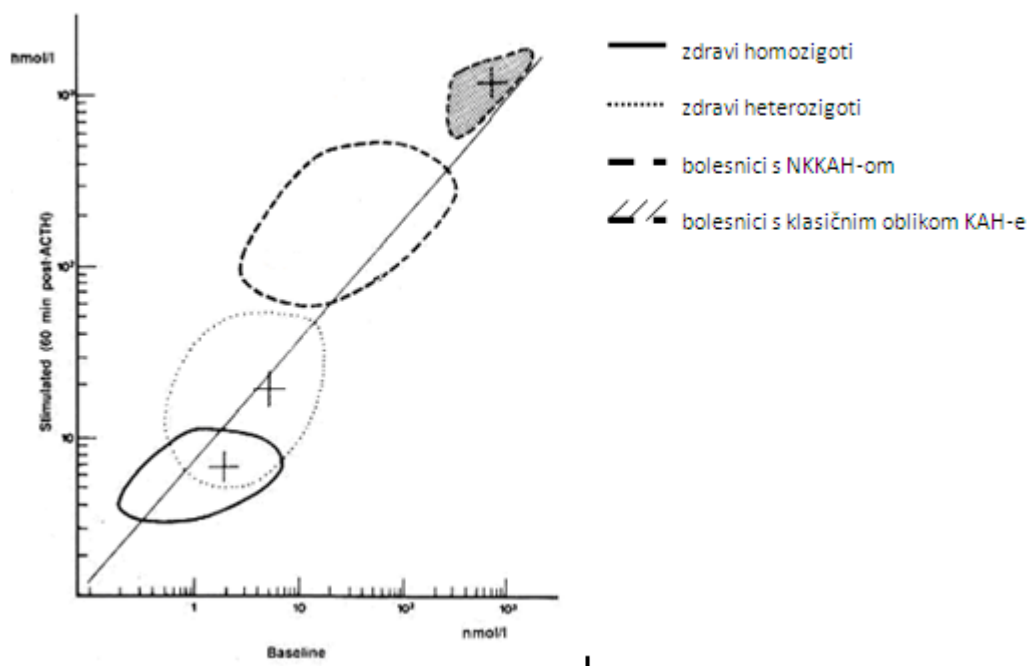
Država	Učestalost NKKAH-e (%)	Referenca
<b>SAD</b>	30,0%	(65)
<b>Brazil</b>	21,1%	(66)
<b>Italija</b>	3,8%	(67)
<b>SAD</b>	15%	(68)
<b>Italija</b>	5,8%	(69)
<b>Španjolska</b>	7,3%	(70)
<b>Australija</b>	5,7%	(71)
<b>Grčka</b>	8,3%	(72)
<b>Francuska</b>	4%	(73)
<b>Italija</b>	36,2%	(74)

#### 1.4. Biokemijski kriteriji za dijagnozu NKKAH-e

Glavni laboratorijski pokazatelj KAH-e zbog manjka 21-OH je povišena koncentracija 17-OHP, glavne hormonske preteče prije mjesta enzimskog poremećaja. Bazalne razine 17-OHP u bolesnika s NKKAH-om nerijetko su na gornjoj granici normale ili tek nešto iznad nje. Dijagnoza bolesti postavlja se stoga mjerenjem koncentracija 17-OHP u folikularnoj fazi bazalno i 60 minuta nakon intravenske stimulacije s ACTH (Synacthen test) i njihovim unošenjem u standardizirani nomogram (75), na osnovu čega je moguće razlikovati zdrave homozigote, heterozigote i bolesnike s različitim oblicima KAH-e (Slika 1.3.).

Bolesnici sa SW oblikom bolesti imaju najviše koncentracije 17-OHP nakon stimulacije s ACTH, a bolesnici sa SV oblikom bolesti imaju nešto niže koncentracije nego bolesnici sa SW KAH-om, iako postoji preklapanje između ova dva oblika bolesti. Porast koncentracije 17-OHP nakon stimulacije s ACTH u bolesnika s NKKAH-om između je koncentracija klinički zdravih heterozigota i bolesnika s klasičnom KAH-om.

Bazalna koncentracija 17-OHP viša od 6 nmol/l u folikularnoj fazi (73, 76) može upućivati na dijagnozu NKKAH-e, no opisani su i bolesnici u kojih je bazalna koncentracija 17-OHP bila manja od 6 nmol/l (9, 19, 35, 42, 74, 77). Stoga je do uvođenja genske analize zlatni standard u dijagnostici bilo određivanje porasta koncentracije 17-OHP nakon stimulacije s ACTH, pri čemu je granična vrijednost porasta koncentracije 17-OHP (engl. «cut-off») u većini studija 30 nmol/l, što je srednja vrijednost gornje granice (+2 SD) koncentracija 17-OHP nakon stimulacije s ACTH u obligatnih heterozigota (75). Uvođenjem molekularne dijagnostike postalo je jasno kako je potrebno preispitati biokemijske kriterije. Dio istraživača smatra kako su sadašnji kriteriji «preblagi» i predlažu da granična vrijednost koncentracije 17-OHP nakon stimulacije s ACTH u bolesnika s NKKAH-om bude 42 nmol/l, 45 nmol/l, 60 nmol/l ili čak 90 nmol/l (19, 74, 77, 78, 79, 80). Korištenjem «preblagih» kriterija heterozigoti, odnosno nosioci samo jedne mutacije gena CYP21A2 pogrešno se proglašavaju bolesnicima s NKKAH-om, dok postavljanjem «strožih» kriterija postoji mogućnost da dio bolesnika s NKKAH-om ostane neprepoznat.



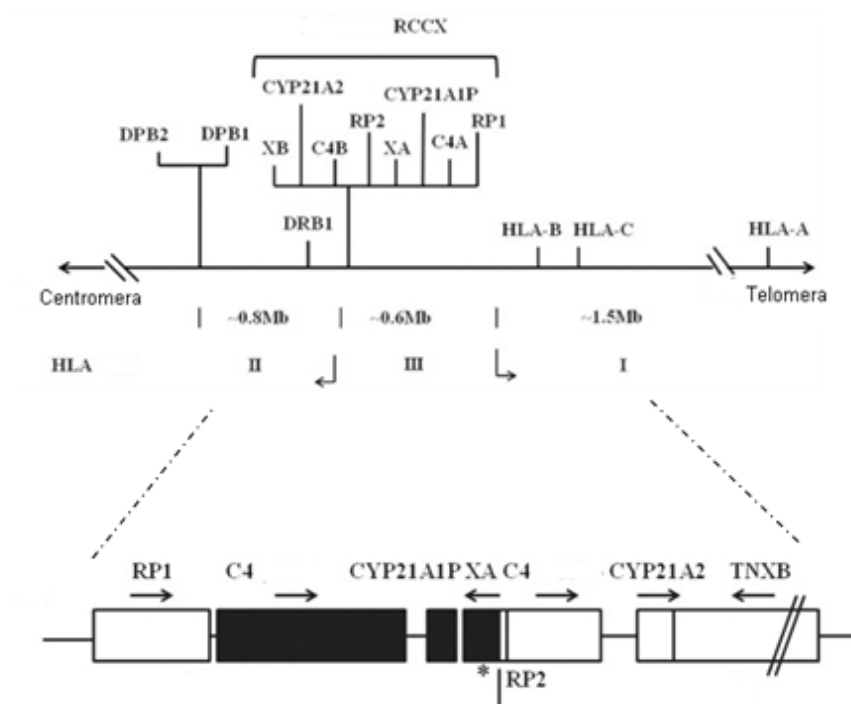
Slika 1.3. Standardizirani nomogram koji u ovisnosti o koncentracijama 17-hidroksiprogesterona bazalno i nakon testa stimulacije s adrenokortikotropnim hormonom omogućuje razlikovanje zdravih homozigota, heterozigota i bolesnika s različitim oblicima kongenitalne adrenalne hiperplazije.

NKKAH – neklasični oblik kongenitalne adrenalne hiperplazije; KAH – kongenitalna adrenalna hiperplazija

## 1.5. Genski poremećaj u bolesnika s KAH-om

### 1.5.1. Gen *CYP21A2*

Gen *CYP21A2* koji kodira enzim 21-hidroksilazu smješten je na kratkom kraku 6. kromosoma (6p21.3), u centralnoj regiji glavnog sustava tkivne snošljivosti (Humani Leukocitni Antigeni, HLA). U neposrednoj blizini funkcionalnog gena *CYP21A2* nalazi se nefunkcionalni pseudogen *CYP21A1P*. Geni *CYP21A2* i *CYP21A1P* u velikoj mjeri su homologni; sastoje se od 10 egzona i 9 introna i podudaraju se u 98% nukleotidnih sekvenci u egzonima i 96% nukleotidnih sekvenci u intronima. U istoj regiji nalaze se geni *C4A* i *C4B* koji kodiraju C4 komponentu komplementa, gen *TNX* koji kodira protein tenascin-X čija poremećena funkcija u nekih bolesnika uzrokuje Ehlers-Danlosov sindrom, gen *RPI* koji kodira enzim serin/treonin kinazu i njihovi nefunkcionalni pseudogeni *TNXA* i *RP2*. Ovi su geni organizirani tako da formiraju gensku jedinicu RCCX, a njihova orijentacija unutar RCCX modula je, od telomere prema centromeri: *RPI-C4A-CYP21A1P-TNXA-RP2-C4B-CYP21A2-TNXB* (81). Zbog visokog stupnja homolognosti i ponavljajućih sekvenci unutar RCCX modula, dolazi do učestalih rekombinacija tijekom mejoze, što uzrokuje nastanak mutacija (Slika 1.4.).



Slika 1.4. Shema genske regije oko gena za 21-hidroksilazu. Prikazan je raspored gena unutar RCCX modula, te položaj RCCX modula u odnosu na gene sustava HLA.

### 1.5.2. Mutacije gena *CYP21A2*

Najveći broj mutacija (oko 95%) koje uzrokuju manjak 21-OH nastaju kao rezultat rekombinacije između aktivnog gena *CYP21A2* i pseudogena *CYP21A1P*. Približno 20% mutacija predstavljaju delecije odsječka DNA u duljini od 30kb, koje obuhvaćaju područje između egzona 3 i egzona 8 gena *CYP21A2* ili delecije gena *CYP21A1P/CYP21A2*, dok je oko 70-75% poremećaja u sintezi enzima 21-OH posljedica unošenja mutacija iz pseudogena *CYP21A1P* genskom konverzijom. Oko 5-10% zahvaćenih gena nosi populacijski specifične, rijetke mutacije, koje nisu rezultat interakcije s pseudogenom (82, 83). Do danas je opisano više od 150 različitih mutacija gena *CYP21A2* (17, 81, 84).

Obzirom na pretpostavljenu razinu enzimске aktivnosti, zasnovanu na *in vitro* istraživanjima, mutacije se dijele na «teške», koje potpuno blokiraju enzimsku aktivnost, «umjereno teške» kod kojih je održano 1-2% enzimске aktivnosti te «blage» mutacije u kojih je očuvano 20-60% normalne enzimске aktivnosti. Obzirom da se radi o autosomno-recesivnoj bolesti, bolesnici na svojim alelima mogu nositi dvije iste mutacije, no većinom su

«složeni heterozigoti» (engl. «*compound heterozygotes*») koji nose dvije različite mutacije gena *CYP21A2*. Klinička slika, odnosno oblik bolesti, ovisi o težini mutacija, a kod «složenih heterozigota» u pravilu odgovara blažoj od dvije mutacije (17, 77, 85).

Najčešće «teške» mutacija gena *CYP21A2* uključuju delecije gena, velike genske konverzije pri čemu dolazi do višestrukog prijenosa mutacija iz pseudogena u gen *CYP21A2*, zamjenu adenzina (A) guaninom (G) na poziciji 656 u intronu 2, što dovodi do poremećaja u izrezivanju (engl. «*splicing*») pre-mRNA, deleciju 8 nukleotida u egzonu 3 (G110Δ8nt), čime se pomiče okvir čitanja (engl. «*reading frame*») mRNA, skupinu (engl. «*cluster*») od 3 mutacije u egzonu 6 (I236N/V237E/M239K) koje uzrokuju zamjenu 3 aminokiseline, engl. «nonsense» mutaciju u egzonu 8 (Q318X) koja dovodi do sinteze nefunkcionalnog enzima, te zamjenu nukleotida na poziciji 2108 egzona 8 (R356W), što uzrokuje zamjenu aminokiselina i teško oštećenje funkcije enzima. Delecije gena, velike genske konverzije, te mutacije G110Δ8nt, Q318X, R356W i Egzon 6 cluster čine tzv. «*null*» mutacije, kod kojih dolazi do potpunog gubitka enzimske aktivnosti, dok je kod mutacije u intronu 2 *in vitro* prisutna minimalna enzimska aktivnost. Najčešća «umjereno teška» mutacija predstavlja zamjenu nukleotida na položaju 999 u egzonu 4 (I172N).

Prva «blaga» mutacija karakteristična za NKKAH smještena u egzonu 7 (V281L) nađena je kod Aškenazi Židova i povezana je s kombinacijom antigena HLA-B14,-DR1 (5). Nakon toga su opisane još tri «blage» mutacije koje su najčešće vezane uz fenotip neklasičnog oblika bolesti: P30L u egzonu 1 (6), R339H u egzonu 8 i P453S u egzonu 10 (7). Sve četiri mutacije su tzv. «*missense*» (mutacija koja mijenja kodon za jednu aminokiselinu u kodon za drugu), a mutacija u egzonu 7 (V281L) povezana je s duplikacijom pseudogena *CYP21A1P* i gena *C4B* (86, 87). Jedna od pretpostavki je kako bi i mikrokonverzije između promotorskih regija gena *CYP21A2* i *CYP21A1P* mogle uzrokovati NKKAH (88).

Obzirom na vrstu mutacije bolesnici se mogu podijeliti u 4 skupine (16, 89): skupina «0» uključuje bolesnike s «*null*» mutacijama na oba alela; skupinu «A» čine homozigoti za mutaciju u Intronu 2 ili bolesnici koji su složeni heterozigoti i nose mutaciju u Intronu 2 u kombinaciji s nekom od «*null*» mutacija, skupina B uključuje bolesnike s «umjereno teškom» mutacijom u egzonu 4 (I172N) na oba alela ili složene heterozigote koji uz mutaciju I172N nose i neku od mutacija iz skupine «0» ili «A». Skupinu «C» čine bolesnici koji nose dvije «blage» mutacije ili kombinaciju «blage» i neke od mutacija iz skupine «0», «A» ili «B». Očekivani fenotip u bolesnika iz skupina «0» i «A» je klasični oblik KAH-e s gubitkom soli,



jednostavna virilizirajuća forma pretpostavljeni je fenotip za bolesnike iz skupine «B», dok je neklasični oblik očekivan u bolesnika iz skupine «C».

Deset najčešćih mutacija gena *CYP21A2* koje se nalaze na oko 95% alela bolesnika s različitim oblicima KAH-e navedene su u Tablici 1.3.

Tablica 1.3. Najčešće mutacije gena *CYP21A2* koje uzrokuju poremećaj funkcije enzima 21-hidroksilaze

Naziv	Mutacija	Egzon/ intron	Aktivnost enzima 21- OH (%)	Oblik mutacije	Referenca
<b>Delecija/ konverzija</b>	-	-	0	«teška»	(90)
<b>P30L</b>	89C>T	Egzon 1	30-60	«blaga»	(6)
<b>Int2</b>	656 A/C>G	Intron 2	<5	«umjereno teška»/«teška»	(91, 92)
<b>Del 8bpE3 (G110Δ8nt)</b>	Δ708-715	Egzon 3	0	«teška»	(93)
<b>I172N</b>	999 T>A	Egzon 4	1-2	«umjereno teška»	(94, 95)
<b>Skupina («cluster») E6 (I236N/V237E/M239K)</b>	1308T>A/1383 T>A/ 1389T>A	Egzon 6	0	«teška»	(93)
<b>V281L</b>	1683 G>T	Egzon 7	20-50	«blaga»	(5, 95)
<b>Q318X</b>	1994 C>T	Egzon 8	0	«teška»	(96)
<b>R356W</b>	2108 C>T	Egzon 8	0	«teška»	(97)
<b>P453S</b>	2578 C>T	Egzon 10	20-68	«blaga»	(7, 98, 99)

Bolesnici s NKKAH-om mogu biti nosioci dvije «blage» mutacije ili su češće «složeni heterozigoti», odnosno nosioci jedne «blage» mutacije u kombinaciji s «teškom» ili «umjereno teškom» mutacijom (9, 35, 77, 85 ). Ovisno o etničkoj pripadnosti, i do 77% bolesnika s NKKAH-om nosi jednu «umjereno tešku» ili «tešku» mutaciju (9, 35, 42, 77).

Najčešća pojedinačna mutacija u bolesnika s NKKAH-om u većini do sada provedenih studija je mutacija u egzonu 7 (V281L) (*Brazil* (77), *Francuska* (35, 85), *Grčka*

(100), Italija (74, 101), SAD (9, 17), Španjolska (102), Velika Britanija (80), zemlje srednje Europe (103)). Među ispitanicima iz Meksika, Japana i Slovenije najčešća «blaga» mutacija je mutacija u egzonu 1 (P30L) (6, 104, 105, 106). Istraživanjem bolesnika s NKKAH-om u Grčkoj i Texasu, SAD, nađen je i veći broj bolesnika s mutacijom u egzonu 10 (P453S) (46,2% (98), 14,3% (100)), dok je u većini drugih studija učestalost ove mutacije među bolesnicima s NKKHA-om manja od 6%.

Kod malog broja bolesnika u kojih je klinički i na osnovu rezultata hormonskih pretraga bila postavljena dijagnoza NKKAH-e nisu nađene mutacije gena *CYP21A2* na jednom ili oba alela. Takvi rezultati mogu ukazivati na postojanje još neotkrivenih mutacija gena *CYP21A2*, ali i na korištenje «preblagih» biokemijskih kriterija pri postavljanju dijagnoze NKKAH-e, čime se možda precjenjuje učestalost NKKAH-e (9, 77, 80, 107, 108, 109).

### **1.5.3. Povezanost mutacija gena *CYP21A2* i sustava HLA**

Zbog položaja gena *CYP21A2* unutar sustava HLA postoji povezanost određenih mutacija gena *CYP21A2* i specifičnih antigena/gena HLA, a braća i sestre oboljeli od KAH-e gotovo su uvijek podudarni u genima HLA (15, 82). U pojedinim etničkim skupinama postoji povezanost određenih antigena/gena HLA i kliničkih oblika bolesti, npr. SW KAH u sjevernoeuropskih bolesnika povezan je s antigenima, to jest haplotipom HLA-A3,-B47,-DR7 (110); među bolesnicima sa SV oblikom bolesti povećana je učestalost antigena HLA-B5 i -B14 (111). Mutacija V281L u egzonu 7, tipična za NKKAH povezana je s antigenima, to jest haplotipom HLA-B14,-DR1, osobito u Aškenazi Židova. Autoimuni haplotip HLA-A1,-B8,-DR3, koji je povezan s brojnim autoimunim bolestima vezan je uz deleciju gena *C4A* i pseudogena *CYP21A1P*, te je stoga u negativnoj korelaciji s manjkom 21-OH.

### **1.5.4. Korelacija genotipa i fenotipa**

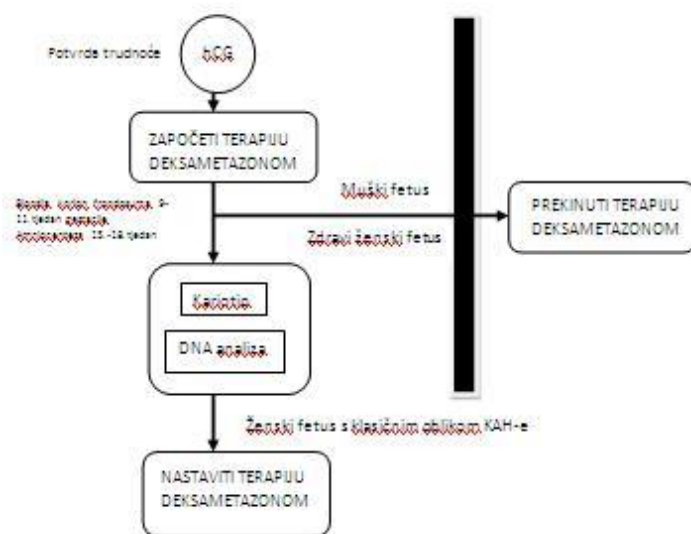
Iako postoji dobra povezanost genotipa i fenotipa kod više od 90% bolesnika (23), opisani su bolesnici čiji je genotip odgovarao klasičnom obliku KAH-e, dok su klinička slika i rezultati hormonskih pretraga odgovarali neklasičnom obliku bolesti (80, 85). S druge strane, opisani su i bolesnici s mutacijama karakterističnim za NKKAH-u (najčešće egzon 1, P30L), kod kojih je klinička slika odgovarala klasičnom obliku bolesti bez gubitka soli (100,

101, 112, 113, 114, 115, 116). Među nekim bolesnicima koji su nosioci mutacije u egzonu 1 (P30L) nesklad genotipa i fenotipa objašnjen je dodatnim mutacijama u promotorskoj regiji gena *CYP21A2*, koje uzrokuju težu kliničku sliku (117, 118, 119). Također nije potpuno jasno zašto dio oboljelih od NKKAH-e s dokazanim mutacijama gena *CYP21A2* i povišenim razinama androgena nema nikakvih kliničkih simptoma («kriptični» oblik bolesti). Utjecaj modifikacijskih gena (85), razlike u perifernom metabolizmu androgena i broju androgenih receptora (16, 89), metabolizmu 17-OHP u nadbubrežnim žlijezdama i ekstraadrenalnom tkivu (120), individualnim potrebama za kortizolom, kao i različita periferna osjetljivost na djelovanje androgena (43, 121) neka su od mogućih objašnjenja.

#### ***1.5.5. Rizik za rađanje djeteta s klasičnim ili neklasičnim oblikom kongenitalne adrenalne hiperplazije. Potreba prenatalne dijagnostike i terapije.***

U obiteljima u kojima postoji rizik za rađanje djeteta s klasičnim oblikom KAH-e postoji mogućnost provođenja prenatalne dijagnostike i terapije.

U ovakvim rizičnim trudnoćama kod majke se započinje peroralna terapija deksametazonom, po mogućnosti prije 7. tjedna gestacije. Deksametazon prolazi fetoplacentalnu barijeru, smanjuje prekomjernu sekreciju fetalnih adrenalnih androgena i na taj način sprječava virilizaciju vanjskog genitala oboljelih ženskih fetusa. Biopsijom korion frondosuma između 9. i 11. tjedna gestacije ili amniocentezom između 15. i 18. tjedna gestacije uzimaju se uzorci fetalnog tkiva. Ukoliko se kariotipizacijom i analizom mutacija gena *CYP21A2* ili tipizacijom HLA u dobivenom tkivu utvrdi kako se radi o muškom djetetu ili zdravom ženskom djetetu, prekida se daljnja terapija deksametazonom. Kod ženskih fetusa s klasičnim oblikom bolesti terapija deksametazonom nastavlja se do kraja trudnoće; ova djeca rađaju se s normalnim ili tek blago viriliziranim vanjskim genitalom (Slika 1.5.).



Slika 1.5. Postupnik za provođenje prenatalne dijagnostike i terapije u obiteljima u kojima postoji rizik za rađanje djeteta s klasičnim oblikom kongenitalne adrenalne hiperplazije (122).

hCG- humani korionski gonadotropin

U bolesnika s KAH-om koji planiraju potomstvo dolazi u obzir provođenje prekonceptijske dijagnostike analizom mutacija gena *CYP21A2* kod partnera bolesnika. Na taj način može se procijeniti rizik za nasljeđivanje bolesti i ponuditi provođenje prenatalne dijagnostike i terapije u rizičnim trudnoćama.

Bolesnici s NKKAH-om imaju veći rizik za rađanje djeteta s klasičnim oblikom KAH-e nego što je rizik u općoj populaciji (učestalost klasične KAH-e u općoj populaciji 1:10000-1:20000; učestalost heterozigotnih nosioca mutacija karakterističnih za klasični KAH u općoj populaciji 1:60 (9, 36)).

Ukoliko je jedan od roditelja bolesnik s NKKAH-om, a genotip drugog roditelja nije poznat, procijenjeni rizik za rađanje djeteta s klasičnim KAH-om iznosi oko 1:480 (pod pretpostavkom kako 50% bolesnika s NKKAH-om nosi jednu «tešku» ili «umjereno tešku» mutaciju (1/2), pri čemu je rizik za nasljeđivanje «teške/umjereno teške» mutacije 25% (1/4), a učestalost heterozigotnih nosioca «umjereno teških» i «teških» mutacija u općoj populaciji je 1:60;  $1/2 \times 1/4 \times 1/60 = 1/480$ ). Rizik za rađanje djeteta s NKKAH-om, ukoliko je jedan od roditelja bolesnik s NKKAH-om je puno veći i procjenjuje se na oko 1:32, obzirom na veću učestalost heterozigotnih nosioca «blage» mutacije u općoj populaciji (1:16) (uz pretpostavku

kako roditelj s NKKAH-om nosi 2 blage mutacije (1/1), pri čemu je rizik za nasljeđivanje jedne mutacije od roditelja s NKKAH-om 50% (1/2), a učestalost nosioca «blage» mutacije u općoj populaciji 1:16;  $1/16 \times 1/1 \times 1/2 = 1/32$ ) (9, 16, 23, 42, 85).

Obzirom na podatke multicentričnih retrospektivnih studija kojima su prikupljeni podaci o ishodima trudnoća bolesnica s NKKAH-om, čini se da je stvarni rizik za rađanje djeteta s klasičnim KAH-om puno veći, osobito u nekim etničkim skupinama u kojima je veća učestalost nosioca klasičnih mutacija među bolesnicima s NKKAH-om (9 centara /Brazil, Italija, Izrael, Francuska, Meksiko, Portugal, SAD, Španjolska, Turska/ - 2.5% djece majki s NKKAH-om ima klasični oblik KAH-e (16); Francuska – 1.5% djece majki s NKKAH-om ima klasični oblik KAH-e (36)).

Preporuča se stoga genotipizirati svakog bolesnika s NKKAH-om kako bi se utvrdilo nosi li mutaciju koja uzrokuje klasični oblik KAH-e, te u slučaju postojanja rizika za rađanje djeteta s klasičnim KAH-om, učiniti genotipizaciju partnera i po potrebi omogućiti provođenje prenatalne dijagnostike i terapije. Nužnost provođenja prekonceptijske i prenatalne dijagnostike u bolesnika s NKKAH-om ovisi o raspodjeli mutacija u pojedinoj populaciji, odnosno zastupljenosti klasičnih mutacija među bolesnicima s NKKAH-om (123, 124). U partnera je nužno učiniti genotipizaciju kako bi se isključila prisutnost «teške/umjereno teške» mutacije gena *CYP21A2* (36, 42).

## **1.6. Dosadašnje spoznaje o NKKAH-i u Hrvatskoj**

Biokemijski pokazatelji i tipizacija gena HLA prve skupine bolesnika s NKKAH-om u Hrvatskoj (8 bolesnika) opisane su 1985. (15, 125). Niti u jednog bolesnika nisu nađeni antigeni HLA-B14,-DR1, koji se inače češće opisuju među bolesnicima s NKKAH-om u drugim populacijama (osobito među Aškenazi Židovima). Međutim, u usporedbi s drugim populacijama uočena je veća učestalost antigena HLA-B35. Ispitivanjem članova obitelji u kojima se rodilo dijete s nekim od oblika KAH-e otkriveno je i 5 bolesnika s «kriptičnim» oblikom NKKAH-e. Bolesnici su bili asimptomatski unatoč povišenim koncentracijama adrenalnih androgena (40).

Tipizacijom HLA veće skupine bolesnika (članovi 49 obitelji u kojima se rodilo dijete s klasičnim oblikom KAH-e; od toga 10 bolesnika s NKKAH-om) također nije uočena povezanost neklasičnog oblika bolesti s antigenima HLA-B14,-DR1 u našoj populaciji. Treba

istaknuti da su dva od deset bolesnika (20%) imali antigen HLA-B14, što je više nego među zdravim ispitanicima (126). Naime, učestalost antigena HLA-B14 u našoj populaciji je 3.1% (127).

«Blaga» mutacija u egzonu 1 (P30L), karakteristična za NKKAH, prvi je puta otkrivena i opisana u bolesnika s NKKAH-om u suradnji grupe istraživača iz SAD-a i Klinike za pedijatriju, KBC Zagreb (6).

Baumgartner-Parzer SM. i suradnici ispitali su učestalosti heterozigotnih nosioca mutacija gena *CYP21A2* među 200 zdravih ispitanika koji nisu imali nikakve simptome hipersekrecije androgena. Ispitivanu skupinu činili su doseljenici porijeklom iz zemalja bivše Jugoslavije (100 ispitanika; 15% porijeklom iz Hrvatske), a kontrolnu skupinu ispitanici austrijske nacionalne pripadnosti (100 ispitanika). Testiranjem je obuhvaćeno 11 točkastih mutacija (P30L, intron 2, I172N, skupina egzon 6, V281L, F307insT, G291S, Q318X, R356W, G424S, P453S), delecije i velike genske konverzije gena *CYP21A2*. Mutacija gena *CYP21A2* na jednom alelu nađena je u 9,5% ispitanika u obje skupine, neovisno o porijeklu (5,5% nosioca «klasičnih» i 4% «neklasičnih» mutacija) (128).

Studija provedena na uzorku od 18 bolesnika (10 ispitanica i 8 ispitanika) s NKKAH-om u Hrvatskoj, u kojoj su prvi put opisane i mutacije gena *CYP21A2* među našim bolesnicima, pokazala je povećanu učestalost mutacije u egzonu 7 (V281L) (2 homozigota i 11 složenih heterozigota). Antigeni HLA-B14,-DR1 nađeni su u 7/13 (53,8%) nosioca mutacije u egzonu 7 (V281L) (34). Iako je virilizacija vanjskog genitala u bolesnika s NKKAH-om rijetka, u tri bolesnice je po porodu uočena klitoromegalija. Od toga je jedna od tri bolesnice bila nosioc mutacije u egzonu 1 (P30L) u kombinaciji s «umjereno teškom» mutacijom u egzonu 4 (I172N), jedna bolesnica je nosioc mutacije u egzonu 7 (V281L) u kombinaciji s «umjereno teškom» mutacijom egzonu 4 (I172N), a jedna bolesnica je homozigot za mutaciju u egzonu 7 (V281L). Bez obzira na genotip, svi bolesnici fertilne dobi (4 ženska i 4 muška ispitanika) ostvarili su potomstvo prije uvođenja nadomjesne terapije glukokortikoidima, ali sve četiri bolesnice imale su poteškoće prilikom začeća.

Ispitivanjem članova obitelji bolesnika s klasičnim oblikom KAH-e, otkrivena je obitelj u kojoj brat bolesnika, oba roditelja i očeva majka boluju od NKKAH-e (116). Ovo je prvi opis obitelji u kojoj su pet članova u tri uzastopne generacije bolesnici s KAH-om. Klinička slika u propositusa odgovara «jednostavnom virilizirajućem» obliku bolesti, unatoč

tome što njegove koncentracije hormona odgovaraju NKKAH-i i što na jednom alelu nosi «blagu» mutaciju P30L.

## 1.7. Heterozigoti

Obzirom da se radi o autosomno-recesivnoj bolesti, roditelji oboljelog od KAH-e su obligatni heterozigoti, a među ostalim članovima obitelji također se češće nađu nosioci jedne mutacije gena *CYP21A2*. Učestalost heterozigota koji su nosioci mutacija tipičnih za NKKAH a u općoj populaciji procjenjuje se na oko 10%, a učestalost nosioca mutacija karakterističnih za klasične oblike KAH-e na oko 1,5%, dok je ukupna učestalost heterozigotnih nosioca mutacija gena *CYP21A2* (karakterističnih za klasični i neklasični oblik bolesti) u populaciji bijele rase oko 7% (1:14) (15).

Heterozigoti, odnosno nosioci jedne mutacije gena *CYP21A2*, imaju blagi poremećaj funkcije hipotalamo-hipofizno-adrenalne osovine. Nakon stimulacije s ACTH oko 50-80% ima nešto više koncentracije 17-OHP. U većine je koncentracija 17-OHP nakon stimulacije s ACTH manja od 30 nmol/l (75, 129), ali se opisuju i heterozigoti čije su koncentracije 17-OHP bile više od 30 nmol/l (74, 79, 80). Obzirom da heterozigoti nakon stimulacije mogu imati koncentracije 17-OHP i u granicama normale, definitivnu dijagnozu moguće je postaviti samo na osnovu genotipizacije (79, 130).

Većina heterozigota nema nikakvih kliničkih simptoma i ne zahtijevaju uvođenje supstitucijske terapije, iako se opisuje povećana učestalost heterozigotnih nosioca mutacije gena *CYP21A2* među bolesnicima s teškim oblikom akni (55, 57), među djecom s prematurnim pubarhama (37,5% (72); 32,9% (74); 22% (131)), ženama s hirzutizmom (21,9% (132); 33,3% (133); 20% (134); 27,3% (135)) i sindromom policističnih jajnika (136). U nekih heterozigota opisuje se povećana sklonost nastanka incidentaloma nadbubrežne žlijezde (26, 137).

## 2. HIPOTEZA I CILJEVI RADA

### 2.1. Hipoteza

Bolesnici s NKKAH-om u Hrvatskoj i članovi njihovih obitelji pokazuju etnički specifičnu distribuciju mutacija gena *CYP21A2* i haplotipova HLA, koje će pokazivati sličnosti s nekim drugim populacijama, te dobru korelaciju genotipa i fenotipa. Razine 17-OHP bazalno i nakon stimulacije s ACTH neće biti u direktnoj korelaciji s tipom mutacije gena *CYP21A2* («blaga/umjereno teška/teška»), odnosno prema biokemijskim kriterijima neće biti moguće pretpostaviti radi li se o bolesniku s dvije «blage» ili kombinacijom «blage» i «umjereno teške/teške mutacije», a u heterozigota biokemijske karakteristike i eventualni simptomi hiperandrogenizma neće biti u direktnoj korelaciji s tipom mutacije gena *CYP21A2*.



## 2.2. Ciljevi rada

- (1) utvrditi učestalost pojedinih mutacija gena *CYP21A2* u bolesnika s NKKAH-om i članova njihovih obitelji u Hrvatskoj, te utvrditi učestalot homozigota i složenih heterozigota među bolesnicima
- (2) usporediti rezultate genotipizacije bolesnika s NKKAH-om u Hrvatskoj s rezultatima sličnih istraživanja provedenim u drugim populacijama
- (3) ispitati povezanosti pojedinih antigena/gena, to jest haplotipova HLA i mutacija gena *CYP21A2* u oboljelih i članova njihovih obitelji, te usporediti dobivene rezultate s rezultatima sličnih istraživanja provedenim u drugim populacijama
- (4) utvrditi najniže bazalne koncentracije 17-OHP i koncentracije 17-OHP nakon stimulacije s ACTH u bolesnika u kojih su dokazane obje mutacije gena *CYP21A2* i usporediti ih s važećim biokemijskim kriterijima za dijagnozu NKKAH-e
- (5) utvrditi koncentracije 17-OHP (bazalne koncentracije i koncentracije 17-OHP nakon stimulacije s ACTH) u ovisnosti o genotipu (bolesnici s dvije «blage» mutacije ili kombinacijom «blage» i «teške» mutacije)
- (6) ispitati odnos genotipa i kliničke slike NKKAH-e
- (7) utvrditi prisutnost simptoma hiperandrogenizma u heterozigotnih nosioca mutacije gena *CYP21A2*, ovisno o tome imaju li «blagu» ili «tešku» mutaciju
- (8) genotipizacijom bolesnika stvoriti preduvjete za prekoncepcijsko savjetovanje i donošenje odluke o eventualnoj primjeni prenatalne dijagnostike i terapije

## **3. ISPITANICI I METODE**

### **3.1. Ispitanici**

Istraživanjem je obuhvaćeno 49 bolesnika s NKKAH-om u Hrvatskoj (18 muških i 31 ženskih ispitanika) koji su otkriveni zbog pojave nekih od simptoma hipersekrecije androgena ili tijekom ispitivanja članova obitelji u kojima je rođeno dijete s nekim od oblika KAH-e. Također je ispitano i 64 članova uže obitelji u dobi od 0 do 70 godina koji su bili dostupni analizi: 46 roditelja (majka i/ili otac) bolesnika, 15 braće i sestara i troje djece bolesnika. U svih bolesnika dijagnostička obrada učinjena je u Zavodu za endokrinologiju i dijabetes Klinike za pedijatriju KBC Zagreb. Ispitanici su uključeni u studiju nakon redovitog pregleda u Zavodu za endokrinologiju i dijabetes Klinike za pedijatriju KBC Zagreb u razdoblju od siječnja 1982. do rujna 2012.

Obzirom da je NKKAH autosomno-recesivna bolest, očekivala bi se jednaka raspodjela bolesti među pripadnicima oba spola, no kako se NKKAH zbog blaže kliničke slike rjeđe otkriva u muških bolesnika, broj ispitanika je bio veći u odnosu na broj ispitanika.

Prije uključanja u studiju svaki ispitanik (ili skrbnik, u slučaju maloljetnih ispitanika) potpisao je informirani pristanak o sudjelovanju u istraživanju.

Studija je odobrena od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Etičkog povjerenstva KBC Zagreb.

### **3.2. Metode istraživanja**

Bolesnici/roditelji ili zakonski skrbnici bolesnika s NKKAH-om, te članovi obitelji telefonski su pozvani na sudjelovanje u ovom znanstvenom istraživanju. Prije uključivanja u studiju usmeno i pismeno su bili upoznati sa svrhom i načinom izvođenja istraživanja.

U svih bolesnika i članova obitelji prikupljeni su anamnestički podaci i podaci iz medicinske dokumentacije, te izvršen klinički pregled.

Dijagnoza NKKAH-e postavljena je na osnovu kliničke slike i biokemijskih kriterija; mjerenjem bazalne koncentracije 17-OHP i koncentracije 17-OHP nakon stimulacije s ACTH te njihovim unošenjem u standardizirani nomogram (Slika 1.3.), na osnovu čega je moguće razlikovati heterozigote i bolesnike s različitim oblicima KAH-e (75). Važno je naglasiti kako su pri izradi ovog nomograma korišteni i podaci bolesnika s KAH-om iz Hrvatske.

### ***3.2.1. Anamnestički podaci i klinički pregled***

U bolesnika s NKKAH-om podaci su prikupljeni iz postojeće medicinske dokumentacije (povijesti bolesti prilikom ambulantnih pregleda i bolničkog liječenja), a od članova obitelji podaci su prikupljeni osobnim strukturiranim intervjuom.

Među bolesnicima s NKKAH-om prikupljeni su sljedeći podaci: dob bolesnika i simptomi prilikom postavljanja dijagnoze, razvoj drugih simptomima hipersekrecije androgena tijekom praćenja bolesnika, tjelesna visina prilikom postavljanja dijagnoze i odstupanje u odnosu na srednju visinu za dob (izraženu kao *standard deviation score* - SDS), koštana dob prilikom postavljanja dijagnoze i odstupanje koštane dobi u odnosu na kronološku dob. U ispitanica koje su imale menarhu prikupljeni su podaci o dobi menarhe, menstrualnim ciklusima, spontanom pobačajima, trudnoćama (spontano začeće ili korištenje metoda umjetne oplodnje, komplikacije u trudnoći, podaci o djetetu nakon rođenja) i fertilitetu (pokušaj začeća i razdoblje spolnih odnosa bez primjene kontracepcije prije začeća), te uzimanje terapije prije i tijekom trudnoće. U spolno zrelih muških ispitanika prikupljeni su podaci o fertilitetu (broj djece, spontano začeće ili korištenje metoda umjetne oplodnje, razdoblje spolnih odnosa bez primjene kontracepcije prije začeća, uzimanje terapije).

Među članovima obitelji prikupljeni su sljedeći podaci: prisutnost simptoma hipersekrecije androgena u bilo kojem razdoblju života, početak pubertetskog razvoja, podaci o menstrualnim ciklusima, spontanom pobačajima, poteškoćama začeća i održavanja trudnoće u spolno zrelih ženskih ispitanica, te podaci o fertilitetu u spolno zrelih muških ispitanika.

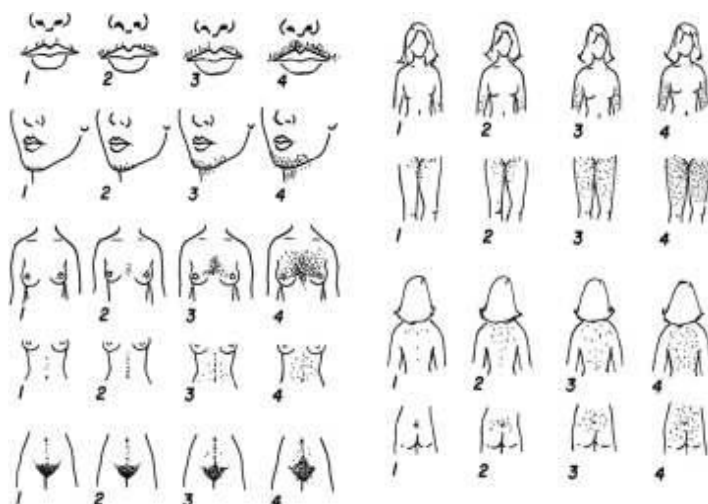
Premature pubarhe definirane su kao pojava pubične dlakavosti prije osme godine života u djevojčica ili prije devete godine u dječaka.

Hirzutizam je procijenjen prema modificiranoj ljestvici po Ferriman-Gallwey-u (138, 139), pri čemu zbroj bodova veći od osam ukazuje na hiperandrogenizam (slika 3.1.).

Poremećaj menstruacijskog ciklusa definiran je kao prisutnost sekundarne amenoreje ili oligomenoreje. Sekundarna amenoreja označava izostanak menstruacije tijekom razdoblja duljeg od tri mjeseca, a oligomenoreja označava produljenje ciklusa pri čemu razmak između dva menstrualna krvarenja traje dulje od 35 dana.

Virilizacija vanjskog genitala u djevojčica procijenjena je ljestvicom prema Praderu (14) (slika 1.2.).

Smanjen fertilitet definiran je kao nemogućnost začeća unatoč redovitim spolnim odnosima bez zaštite tijekom razdoblja od 18 mjeseci.



Slika 3.1. Modificirana ljestvica za procjenu hirzutizma po Ferriman-Gallwey-u (139).

Visina ispitanika uspoređena je sa standardnim centilnim krivuljama (National Center for Health Statistics u suradnji s National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, 2000) iz čega je izračunat SDS (*standard deviation score*) prema formuli: (tjelesna visina – srednja visina za dob i spol prema percentilnim krivuljama)/1 S.D. prema percentilnim krivuljama za istu dob i spol.

Koštana zrelost u bolesnika procijenjena je na osnovu rentgenskih snimaka šake i zapešća, usporedbom sa standardnim snimkama prema Greulichu i Pyleu (140) iz čega je izračunata razlika između koštane dobi i kronološke dobi.

### 3.2.2. Laboratorijski testovi

#### 3.2.2.1 Mjerenje koncentracija hormona

Uzorci krvi za određivanje bazalnih koncentracija hormona u svih ispitanika uzeti su u jutarnjim satima (između 07.00 i 10.00 h). U ženskih ispitanica uzorci su uzeti u folikularnoj fazi ciklusa.

Ispitanicima su iz uzoraka periferne krvi određene koncentracije: 17-hidroksiprogesterona (17-OHP), androstendiona, testosterona i kortizola (tijekom ACTH testa).

Koncentracije hormona izmjerene su standardnim biokemijskim metodama s ligandima. Koncentracije 17-OHP, androstendiona i testosterona određene su automatiziranom kemiluminiscentnom metodom (*Ortho Clinical Diagnostics, Amersham, Velika Britanija*), a koncentracije kortizola određene su enzimimunokemijskom metodom (ELISA) (*DRG Instruments, Marburg, Njemačka*).

#### 3.2.2.2 Test stimulacije s ACTH - 60-minutni test

Test stimulacije s ACTH izvršen je u jutarnjim satima (08.00-10.00 h); u ženskih ispitanica određivanje je izvršeno u folikularnoj fazi ciklusa. Ispitanicima je nakon postavljanja venskog puta izvađeno 5 ml krvi za mjerenja bazalnih koncentracija hormona (17-OHP, kortizola i androstendiona), a potom je intravenski injicirano 0,25 mg sintetskog ACTH (*Synacthen Ciba, 0.25 mg/1 ml, Novartis Pharma Schweiz AG, Bern*) u obliku bolusa. Nakon 60 minuta ponovo je uzeto 5 ml krvi za mjerenje koncentracija hormona nakon stimulacije (17-OHP, kortizol i androstendion).

Bazalne razine 17-OHP i razine 17-OHP nakon stimulacije s ACTH unešene su u standardizirani nomogram (75) i uspoređene s referentnim vrijednostima (Slika 1.3.).

### 3.2.3. Analiza mutacija gena *CYP21A2*

#### 3.2.3.1 Izolacija DNA

Svim ispitanicima uzeto je 10 ml pune krvi u epruvete s dodatnim antikoagulansom EDTA za izolaciju DNA i tipizaciju gena HLA (dojenčadi u dobi do 6 mjeseci uzeti su uzorci od 5 ml pune krvi).

Iz krvi je DNA izolirana upotrebom komercijalnih kitova NucleoSpin® Blood kit za izolaciju DNA prema protokolu preporučenom od strane proizvođača (Macherey-Nagel GmbH&Co., Düren, Njemačka).

U eppendorf epruvetu od 1,5 ml pipetirano je 200 µl pune krvi sobne temperature i dodano 25 µl proteinaze K (20 mg/ml). Potom smo dodali 200 µl B3 pufera, izmiješali uzorak na miješalici i kratkotrajno centrifugirali. Uzorak se inkubira 10 min u vodenoj kupelji na 70°C, a zatim smo dodali 210 µl apsolutnog etanola, ponovno dobro izmiješali i kratkotrajno centrifugirali. Cijeli uzorak (~630 µl), prethodno ohlađen na sobnu temperaturu, nanijeli smo na NucleoSpin® Blood kolumnu i potom centrifugirali 1 minutu na 14000 x g.

Nakon centrifugiranja, kolumnu smo isprali s 500 µl pufera za ispiranje (BW pufer), centrifugirali 1 minutu na 14000 x g i na kraju isprali s 600 µl B5 pufera, te centrifugirali 1 minutu na 14000 x g. Kolumnu smo zatim stavili u eppendorf epruvetu od 1,5 ml, nanijeli 100 µl pufera za otapanje DNA (BE pufer), prethodno zagrijanog na 70°C, na sredinu filtera i inkubirali 1 minutu na sobnoj temperaturi. Uzorak smo potom centrifugirali 1 minutu na 14000 x g.

#### 3.2.3.2 Određivanje mutacija gena *CYP21A2*

Ovom metodom ispitana je prisutnost 8 najčešćih mutacija gena *CYP21A2*: egzon 1 (P30L), intron 2 (nt 656 A/C>G), egzon 3 (delecija 8-nt; 8-nt del), egzon 4 (I172N), egzon 6 (I236N, V237E, M239K), egzon 7 (V281L), egzon 8<sub>318</sub> (Q318X) i egzon 8<sub>356</sub> (R356W) (Tablica 1.1.). Analiza je provedena prema postupku koji su opisali Wilson i sur. (130).

Za svakog ispitanika postoji 16 različitih reakcija koje uključuju 8 najčešćih mutacija, odnosno za svaku od 8 testiranih mutacija postavljaju se dvije reakcije za normalan i mutirani alel.

U eppendorf epruveti od 200 µl pripremljena je reakcijska otopina za svaki pojedinačni uzorak DNA koja je sadržavala sljedeće komponente: 9,2 µl aquae p.i., 1,5 µl 10xPCR pufera (*Quiagen, Njemačka*; 50 mmol/l KCl, 10 mmol/l Tris-HCl (pH 8,3), 1,5 mmol/l MgCl), 0,6 µl početnice 5', 0,6 µl početnice 3', 0,3 µl kontrolnih početnica, 1,2 µl dNTP (2,5 mM) i 0,075 µl Taq polimeraze (*HotStarTaq<sup>TM</sup> DNA POLYMERASE, Quiagen, Njemačka*). U tako pripremljenu PCR mješavinu dodano je 2 µl DNA ispitanika, reakcijska otopina je kratko centrifugirana i potom stavljena u aparat za automatsko umnažanje (*Mastercycler Gradient Eppendorf, GeneAmp PCR System 2700 Applied Biosystems*) na odgovarajući program, kao što su opisali Wilson i sur. (130). Rezultati amplifikacije DNA prikazani su elektroforezom na 1,5% agaroznom gelu uz dodatak etidij-bromida.

### **3.2.4. Tipizacija antigena/gena HLA razreda I i II**

Određivanje antigena HLA razreda I i II izvedena je metodom mikrolimfocitotoksičnosti na limfocitima periferne krvi (141, 142).

Tipizacija gena HLA razreda I i II učinjena je molekularnom metodom i to lančanom reakcijom polimeraze i početnicama specifičnim za pojedini alel/gen HLA (PCR-SSP, od eng. *Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Primers*) prema metodi koju su opisali Olerup i sur. (143).

Rezultati umnažanja DNA vizualizirani su elektroforezom na 1,5% agaroznom gelu.

### **3.2.5. Statistička obrada prikupljenih podataka**

Podaci su prikazani tablično i grafički. S obzirom na neparametrijsku raspodjelu kvantitativnih vrijednosti koja je potvrđena Smirnov-Kolmogorovljevim testom, u daljnjoj analizi koristili su se neparametrijski testovi i deskriptivni prikaz podataka kroz medijane i interkvartilne raspone. Kategorijske vrijednosti su prikazane kroz frekvencije i udjele.

Razlike u kvantitativnim vrijednostima između dviju skupina (muški vs. ženski spol, A vs. B skupina, simptomatski vs. nesimptomatski bolesnici) analizirane su Mann-Whitney U testom. Razlike između tri skupine (bolesnici, heterozigoti, zdravi homozigoti) analizirane su Kruskal-Wallis testom, s dodatnim post hoc testiranjem u kojem se koristio Mann-Whitney U test. Razlike u kategorijskim vrijednostima su prikazane hi kvadrat testom, odnosno Fischerovim testom gdje je bilo moguće. Predikcija graničnih vrijednosti 17OH bazalno i nakon stimulacije za prisustvo bolesti određena je ROC krivuljom. Sve p vrijednosti manje od 0.05 su smatrane značajnima. U analizi se koristila programska podrška IBM SPSS Statistics, verzija 19.0.0.1 ([www.spss.com](http://www.spss.com)) te MedCalc for Windows, verzija 12.0 ([www.medcalc.be](http://www.medcalc.be)).



## 4. REZULTATI

Provedeno je ispitivanje kliničkih, biokemijskih i molekularnih karakteristika u skupini od 49 bolesnika s NKKAH-om (18 muških (36,70%) i 31 ženskih (63,30%) ispitanika), te u 64 članova obitelji (46 roditelja, 15 braće i sestara, te troje djece bolesnika s NKKAH-om).

Svim bolesnicima procijenjen je stupanj hiperandrogenizma, te izmjerena bazalna koncentracija 17-OHP. U 41/49 (83,67%) bolesnika učinjen je ACTH test i izmjerene su koncentracije 17-OHP 60 minuta nakon stimulacije sa sintetskim ACTH, a 44 od 49 (89,80%) bolesnika tipizirani su za gene HLA. Analiza mutacija gena *CYP21A2* napravljena je kod 47/49 (95,92%) bolesnika, odnosno ukupno je ispitano 94 alela. Naime, dva bolesnika (#42 i #44) su preminula prije mogućnosti provođenja genske analize.

Prisutnost simptoma hiperandrogenizma ispitana je i u svih članova obitelji. U skupini od 38 članova obitelji (38/64; 59,38%) izmjerene su bazalne koncentracije 17-OHP i napravljen ACTH test, te izmjerene koncentracije 17-OHP 60 minuta nakon stimulacije. U skupini od 50 članova obitelji (50/64; 78,13%) tipizirani su geni HLA, a u 54 članova obitelji (54/64; 84,380%), odnosno 108 alela provedena je molekularna analiza gena *CYP21A2*.

### 4.1. Kliničke osobine bolesnika s NKKAH-om

U skupini od 27 bolesnika (55,10%) NKKAH je otkriven zbog kliničkih znakova hipersekrecije androgena (4 muških - 14,80% i 23 ženskih - 85,20% ispitanika), a kod 22 bolesnika (44,90%) bolest je utvrđena ispitivanjem članova obitelji u kojima je prethodno otkriven bolesnik s klasičnim ili neklasičnim oblikom KAH-e (14 muških – 63,60% i 8 ženskih – 36,40% ispitanika).

Dvanaest bolesnika otkriveno je analizom članova iz devet obitelji u kojima se rodilo dijete s klasičnim oblikom KAH-e, i to šest bolesnika ( #13, #25, #33, #37, #42, #44) u šest

obitelji u kojima se rodilo dijete s KAH-om koje je gubioc soli i šest bolesnika (#11, #12, #32, #35, #36, #40) u tri obitelji u kojima se rodilo dijete s jednostavnim virilizirajućim oblikom bolesti. Bolesnica #8 rodila je žensko dijete s blagom klitoromegalijom u kojeg nije potvrđena dijagnoza NKKAH-e, a klitoromegalija je kasnije spontano regredirala. Analizom članova ove obitelji kod majke djeteta (bolesnica #8) je postavljena dijagnoza NKKAH-e (Tablica 4.1.1. i Tablica 4.1.3.).

U devet obitelji otkrivena su dva ili više članova s NKKAH-om (bolesnice #3 i #4, te #15, #16 i #17 su sestre; #38 i #39, te #46 i #47 su braća, #21 i #41, #23 i #43, te #31 i #45 su brat i sestra, #10 i #34 su kćerka i otac). U jednoj obitelji otkrivena su četiri bolesnika s NKKAH-om u tri generacije: bolesnici #12 i #35 su majka i sin, bolesnici #11 i #35 su supružnici, a njihovo dijete je bolesnik #36 (probandi u obitelji označeni su kurzivom).

Ukupno je u skupini od 49 bolesnika 38 bolesnika bilo nesrodno (probandi; 77,55%), a 11 bolesnika su srodni probandima (braća, sestre i roditelji bolesnika, 28,95%). Od 31 ispitanice s NKKAH-om, 27 ispitanica je nesrodno (87,09%). Od 18 ispitanika s NKKAH-om, 11 ispitanika je nesrodno (61,11%).

Prosječna dob prilikom postavljanja dijagnoze u našem uzorku ispitanika je  $15,24 \pm 12,46$  godina. Kod 33 bolesnika (33/49; 67,35%) dijagnoza je postavljena prije 18. godine života, a 16 bolesnika (16/49; 32,65%) je otkriveno nakon 18. godine života. Prosječna dob prilikom postavljanja dijagnoze u bolesnika koji su otkriveni zbog simptoma hiperandrogenizma je  $10,0 \pm 6,59$  godina (u rasponu od 0 do 31 godinu).

#### ***4.1.1. Klinički simptomi bolesnica s NKKAH-om prilikom postavljanja dijagnoze i njihova distribucija (N=31)***

U skupini od 31 bolesnice s NKKAH-om, 23 bolesnice su otkrivene zbog simptoma hipersekrecije androgena. Osam bolesnica je otkriveno ispitivanjem članova obitelji; pet od njih je imalo znakove androgene hipersekrecije, jedna bolesnica nije imala kliničkih simptoma, no imala je ubrzano koštano dozrijevanje (#4), a samo dvije bolesnice nisu imale nikakvih simptoma (#16 i #17). Ukupno je 29 bolesnica (29/31; 93,55%) imalo simptome ili posljedice hipersekrecije androgena (Tablica 4.1.1).

Među bolesnicama koje su otkrivene zbog pojave simptoma hiperandrogenizma (N=23) vodeći simptom prilikom postavljanja dijagnoze bio je preuranjeni razvoj pubične dlakavosti (10/23; 43,48%) (Tablica 4.1.2).

Najčešće tegobe u bolesnica s kliničkim simptomima hiperandrogenizma, neovisno o dobi i načinu otkrivanja bolesti (N=28) su akne i komedoni (16/28; 57,14%), hirsutizam (13/28; 46,43%) i preuranjena pubična dlakavost (13/28; 46,43%).

Ubrzana koštana zrelost nađena je u 90,91% bolesnica, no važno je napomenuti kako je koštana dob ispitana u samo 11 bolesnica, od kojih je 10 imalo ubranu koštanu zrelost.

Tablica 4.1.1 Klinički simptomi bolesnica s nekласičnim oblikom kongenitalne adrenalne hiperplazije (N=31) prilikom postavljanja dijagnoze

Redni broj	Dob postavljanja dijagnoze <sup>1</sup>	Preuranjena pubična dlakavost <sup>1</sup>	Preuranjena aksilarna dlakavost	Akne i komedoni	Hirzutizam <sup>2</sup>	Klitoromegalija	Menarhe <sup>1</sup>	Poremećaj menstrualnog ciklusa	Ubrzano koštano dozrijevanje
1.	11,00	+(4,50) <sup>#</sup>	-	+	-	-	10,66	-	NP
2.	6,75	+(5,58) <sup>#</sup>	+	+	-	-	-	-	+
3.	5,33	+(5,08) <sup>#</sup>	-	+	-	-	-	-	+
4.*~	3,50	-	-	-	-	-	-	-	+
5.	8,17	+(7,50) <sup>#</sup>	+	-	-	-	-	-	+
6.	0,03	-	-	-	-	+	-	-	NP
7.	8,00	-	+	+	+	-	9,00	-	NP
8.*	24,00	-	-	+	+(11)	-	11,00	-	NP
9.	18,00	-	-	+	-	-	15,00	+	NP
10.	0,01	-	-	-	-	+	-	-	NP
11.*	30,00	+(7,50)	+	-	+(19)	+	12,00	+	NP
12.*~	55,00	-	-	-	+	-	NP	+	NP
13.*	27,00	-	-	-	+	-	NP	+	NP
14.	6,50	+(5,00) <sup>#</sup>	-	-	-	-	-	-	+
15.	10,42	-	-	+	+(14)	-	11,00	-	+
16.*~	4,00	-	-	-	-	-	-	-	NP
17.*~	4,00	-	-	-	-	-	-	-	NP
18.	7,25	+(7,00) <sup>#</sup>	-	+	-	-	-	-	+
19.	8,00	+(8,00) <sup>#</sup>	-	+	-	-	10,42	-	-
20.	0,08	-	-	-	-	+	-	-	NP
21.	7,00	+(7,00) <sup>#</sup>	-	+	+	-	11,00	+	+
22.	5,50	+(5,00) <sup>#</sup>	-	-	-	-	-	-	NP
23.	15,00	-	-	+	+	-	14,00	+	NP
24.	8,42	+(6,50) <sup>#</sup>	-	+	-	-	-	-	+
25.*	34,00	-	-	-	+	-	NP	-	NP
26.	18,00	-	-	-	+	-	NP	+	NP
27.	15,00	-	-	+	+	-	NP	-	NP
28.	7,00	+(6,00) <sup>#</sup>	-	+	-	-	-	-	+
29.	31,00	-	-	-	+(12) <sup>#</sup>	-	17,00	-	NP
30.	13,92	-	-	+	-	+	11,83	+	NP

31.	14,92	+	(6,00)	-	+	+	(14) <sup>#</sup>	-	11,00	+	<sup>#</sup>	NP
-----	-------	---	--------	---	---	---	-------------------	---	-------	---	--------------	----

\*bolesnica je otkrivena ispitivanjem članova obitelji; ~srodna bolesnica, <sup>#</sup>vodeći simptom prilikom postavljanja dijagnoze; NP-nije poznato

<sup>1</sup>dob je izražena u godinama (dob pojave preuranjene pubične dlakavosti navedena je u zagradama); <sup>2</sup>stupanj hirzutima, kada je to moguće, izražen je u stupnjevima po Ferriman-Gallway-u (navedeno u zagradi); <sup>3</sup>tijekom praćenja bolesnica je razvila hirzutizam (u dobi od 14,83 godina hirzutizam od 8 stupnjeva po Ferriman-Gallway -u); <sup>4</sup>u dobi od 13 godina bolesnica je liječena zbog izraženih akni i difuzne alopecije, kasnije tijekom praćenja razvila je hirzutizam.

Tablica 4.1.2. Raspodjela učestalosti simptoma među bolesnicama s neklasičnim oblikom kongenitalne adrenalne hiperplazije koje su otkrivene zbog simptoma hiperandrogenizma (N=23)

Simptomi prilikom postavljanja dijagnoze	Broj bolesnica	Učestalost (%)
Preuranjena pubična dlakavost	10	43,48
Poremećaj menstruacijskog ciklusa	3	13,04
Klitoromegalija	3	13,04
Hirzutizam	2	8,69
Preuranjena aksilarna dlakavost	1	4,35
Preuranjena pubična i aksilarna dlakavost	1	4,35
Akne	1	4,35
Akne i poremećaj menstruacijskog ciklusa	1	4,35
Hirzutizam i poremećaj menstruacijskog ciklusa	1	4,35

U djevojčica koje su se prezentirale kliničkom slikom preuranjene pubične dlakavosti prosječna dob pojave pubične dlakavosti je 6,24±1,14 godine, pri čemu je najranija pojava pubične dlakavosti uočena u dobi od 4,5 godine (bolesnica #1). U djevojčica se pojava pubične dlakavosti prije osme godine života smatra preuranjenom.

Prosječna dob menarhe u skupini bolesnica s NKKAH-om je  $11,99 \pm 2,24$  godine. U 8/12 bolesnica u kojih je poznata dob menarhe dijagnoza NKKAH-e je postavljena nakon što je uspostavljen menstruacijski ciklus.

Usporedbom dobi menarhe u našem uzorku ispitanica nađena je statistički značajna razlika ( $p < 0,01$ ) u odnosu na prosječnu dob menarhe u Hrvatskoj (144). U bolesnica s NKKAH-om menarha je nastupila ranije u odnosu na prosječnu dob menarhe u zdravih ispitanica u Hrvatskoj (bolesnice s NKKAH-om:  $11,99 \pm 2,24$  godine,  $N=12$  vs. zdrave ispitanice:  $12,92 \pm 1,19$  godina,  $N=888$ ;  $t=2.648$ ,  $p=0,0082$ ). Također je u našoj skupini bolesnica s NKKAH-om menarha nastupila ranije u odnosu na prosječnu dob menarhe ispitanica s NKKAH-om u Francuskoj (35) (razlika je statistički značajna; bolesnice s NKKAH-om u Francuskoj:  $12,50 \pm 1,60$  godine,  $N=190$ ;  $t=4.243$ ,  $p < 0.0001$ ).

#### ***4.1.2. Klinički simptomi bolesnika s NKKAH-om prilikom postavljanja dijagnoze i njihova distribucija (N= 18)***

U skupini od 18 bolesnika s NKKAH-om, kod deset ispitanika (55,56%), od kojih su svi otkriveni analizom članova obitelji, nije bilo nikakvih simptoma hipersekrecije androgena. Osam bolesnika (44,44%) pokazalo je znakove androgene hipersekrecije; među njima četiri bolesnika su otkrivena analizom članova obitelji (Tablica 4.1.3.).

Najčešći simptom prisutan u svih simptomatskih bolesnika (8/8) je preuranjena pubična dlakavost (Tablica 4.1.4.). Prosječna dob pojave pubične dlakavosti je  $8.50 \pm 1.23$  godine, pri čemu je najranija pojava pubične dlakavosti uočena u dobi od 6.98 godina (bolesnik #46). U dječaka se pojava pubične dlakavosti prije desete godine života smatra preuranjenom.

Koštano dozrijevanje ispitano je samo u 4 bolesnika; u svih ispitanih ono je bilo ubrzano (100%).

Tablica 4.1.3. Klinički simptomi bolesnika s s neklasičnim oblikom kongenitalne adrenalne hiperplazije (N=18) prilikom postavljanja dijagnoze

Redni broj	Dob postavljanja dijagnoze <sup>1</sup>	Preuranjeni pubična dlakavost	Akne i komedoni	Hirzutizam	Povećanje genitala	Ubrzana koštana zrelost
32.*	33,00	+ (10,0)	-	-	-	NP
33.*	32,00	-	-	-	-	NP
34.*~	38,00	-	-	-	-	NP
35.*	32,00	+ (9,50)	-	+	-	NP
36.*~	0,38	-	-	-	-	NP
37.*	32,00	-	-	-	-	NP
38.*	5,83	-	-	-	-	NP
39. <sup>2</sup> ~	8,00	+ (7,00)	-	-	+	NP
40.*	7,00	-	-	-	-	NP
41.*~	12,00	-	-	-	-	NP
42.*	35,00	-	-	-	-	NP
43.*~	20,00	-	-	-	-	NP
44.*	32,00	-	-	-	-	NP
45.*~	14,92	+ (8,00)	-	-	+	NP
46.	7,33	+ (6,98)	+	-	-	+
47.*~	10,79	+ (9,50)	+	-	+	+
48.	9,95	+ (8,50)	-	-	-	+
49.	9,67	+ (9,00)	-	-	+	+

\*bolesnik je otkriven ispitivanjem članova obitelji; ~srodni bolesnik, NP - nije poznato

<sup>1</sup>dob je izražena u godinama, <sup>2</sup>početak kliničke prezentacije u dobi od 7 godina promjenama ponašanja (razdražljivost, agresivnost, problemi koncentracije, smetnje učenja i ponašanja)

Tablica 4.1.4. Raspodjela učestalosti simptoma među bolesnicima s nekласičnim oblikom kongenitalne adrenalne hiperplazije koji su imali neki od simptoma hiperandrogenizma (N=8)

<b>Simptomi postavljanja dijagnoze</b>	<b>prilikom</b>	<b>Broj bolesnika</b>	<b>Učestalost (%)</b>
<b>Preuranjena pubična dlakavost</b>		8	100,00
<b>Povećanje genitala (penisa)</b>		4	50,00
<b>Akne i komedoni</b>		2	25,00
<b>Hirzutizam</b>		1	12,50

#### ***4.1.3. Tjelesna visina i koštana zrelost u bolesnika s NKKAH prije puberteta***

U skupini od 19 bolesnika (13 djevojčica i 6 dječaka) kod kojih je dijagnoza NKKAH-e postavljena prije početka pravog izoseksualnog puberteta prikazano je odstupanje tjelesne visine od prosjeka za dob izraženo kao *standard deviation score (SDS)*, te odstupanje koštane dobi od kronološke (Tablica 4.1.5.).

Pojava pravog izoseksualnog pubertetskog razvoja u djevojčica je procijenjena povećanjem dojki (stupanj 2 ili više po Tanneru), a u dječaka povećanjem volumena testisa (više od 4 ml po Praderu).



Tablica 4.1.5. Tjelesna visina i koštana dob djevojčica i dječaka s neklasičnim oblikom kongenitalne adrenalne hiperplazije na početku puberteta (N= 19)

Redni broj	Spol	Tjelesna visina <sup>1</sup>	SDS	Dob	Koštana dob – kronološka dob <sup>2</sup>
1.	Ž	146,3	+0,316	11,00	NP
2.	Ž	121,6	+0,360	6,75	+2,92
3.	Ž	123,7	+2,724	5,33	+3,75
4.	Ž	105,4	+1,907	3,50	+0,66
5.	Ž	128,1	-0,039	8,17	+3,00
14.	Ž	118,0	-0,060	6,50	+0,67
15.	Ž	160,8	+3,027	10,42	+2,00
16.	Ž	101,2	-0,084	4,00	NP
17.	Ž	102,4	+0,214	4,00	NP
18.	Ž	130,0	+1,375	7,25	+3,50
19.	Ž	125,0	-0,428	8,00	0,0
24.	Ž	143,6	+2,475	8,42	+2,58
28.	Ž	121,0	-0,052	7,00	+4,00
38.	M	130,0	+3,142	5,83	NP
39.	M	147,0	+3,496	8,00	NP
46.	M	145,0	+4,280	7,33	+2,17
47.	M	162,5	+3,300	10,79	+1,71
48.	M	147,0	+1,439	9,95	+1,00
49.	M	136,4	-0,049	9,67	+3,33

SDS - *standard deviation score*; Ž - ženski spol, M - muški spol, NP - nije poznato; dob je izražena u godinama (godine+broj mjeseci/12); <sup>1</sup>tjelesna visina izražena je u centimetrima i mjerena je prilikom postavljanja dijagnoze; <sup>2</sup>razlika koštane dobi i kronološke dobi izražena je u godinama

Srednja vrijednost odstupanja tjelesne visine u odnosu na prosječnu visinu za dob (SDS) je  $1,44 \pm 1,54$ . U 6/19 bolesnika tjelesna visina odstupa za više od +2 SDS u odnosu na prosječnu.

Koštana zrelost određena je u 14 bolesnika; njih 13 (92,86%) imalo je ubrzano koštano dozrijevanje. Samo kod jednog bolesnika koštana dob je odgovarala kronološkoj.

Prosječno odstupanje koštane dobi u odnosu na kronološku prilikom postavljanja dijagnoze NKKAH-e je  $2,24 \pm 1,28$  godine, pri čemu najjače odstupanje iznosi +4 godine.

#### ***4.1.4. Utjecaj spola na prisutnost simptoma hiperandrogenizma***

U skupini bolesnika s NKKAH-om ispitali smo razliku dobi postavljanja dijagnoze, dobi pubarhe, odstupanje tjelesne visine u odnosu na prosječnu visinu za dob i odstupanje koštane dobi u odnosu na kronološku dob, te razliku u udjelu simptomatskih i asimptomatskih bolesnika obzirom na spol ispitanika (Tablica 4.1.6.).

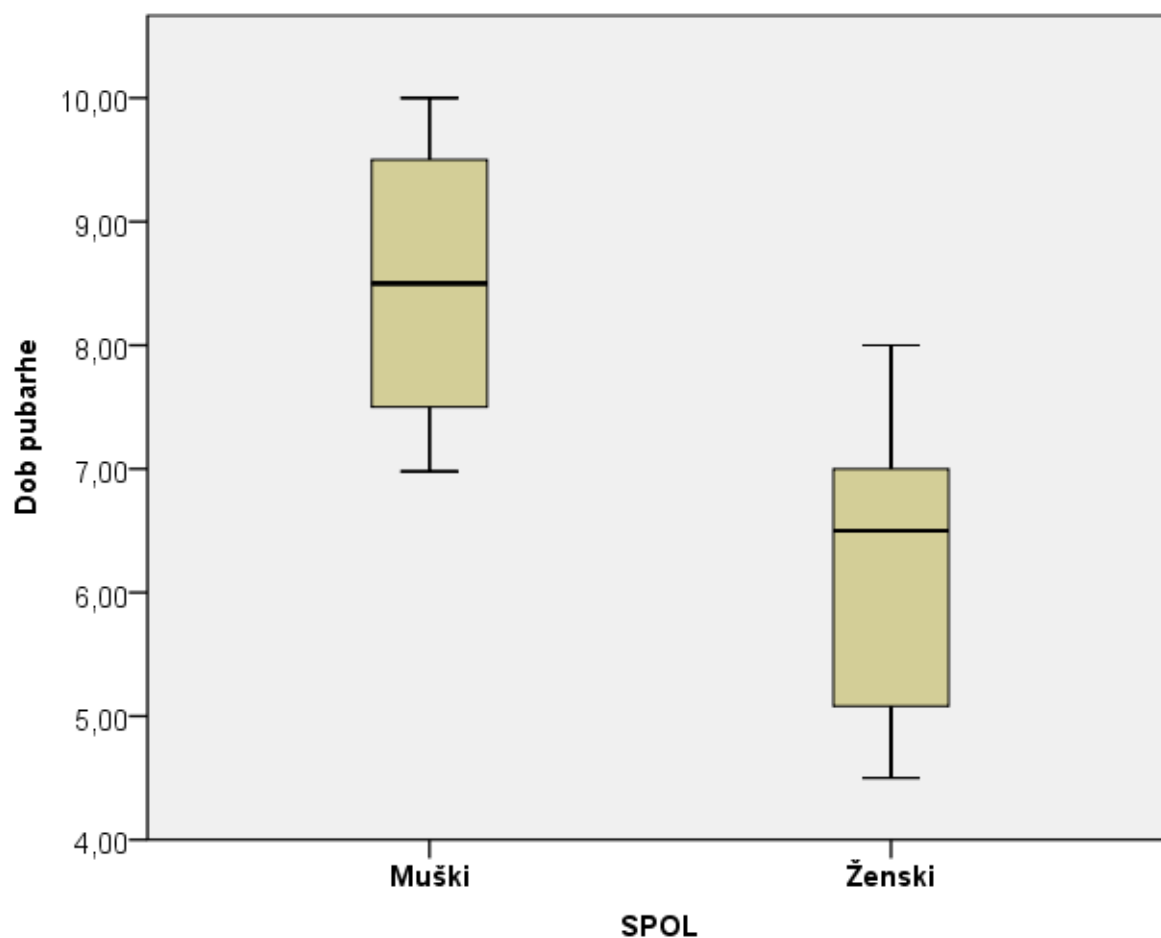
Nađena je statistički značajna razlika u dobi pojave pubarhe i odstupanju tjelesne visine u odnosu na prosječnu visinu za dob obzirom na spol. Djevojčice s NKKAH-om imale su statistički značajno raniju dob pojave pubarhe u odnosu na muške ispitanike (muški ispitanici:  $N=7$ ;  $X_m = 8,50 \pm 1,23$  godina,  $\text{medijan}_m = 8,50$  godina; ženske ispitanice:  $N=13$ ;  $X_z = 6,24 \pm 1,14$  godina,  $\text{medijan}_z = 6,50$  godina,  $p=0,004$ ) (Slika 4.1.). Dječaci s NKKAH-om su statistički značajno viši u odnosu na prosječnu visinu za dob prilikom postavljanja dijagnoze u odnosu na djevojčice s NKKAH-om (muški ispitanici:  $N=6$ ;  $X_m = 2,60 \pm 1,60$ ,  $\text{medijan}_m = 3,22$ ; ženske ispitanice:  $N=13$ ;  $X_z = 0,90 \pm 1,23$ ,  $\text{medijan}_z = 0,32$ ,  $p=0,023$ ) (Slika 4.2.).

U našoj skupini ispitanika nismo našli statistički značajnu razliku u dobi postavljanja dijagnoze i odstupanju koštane dobi u odnosu na kronološku dob obzirom na spol ispitanika.

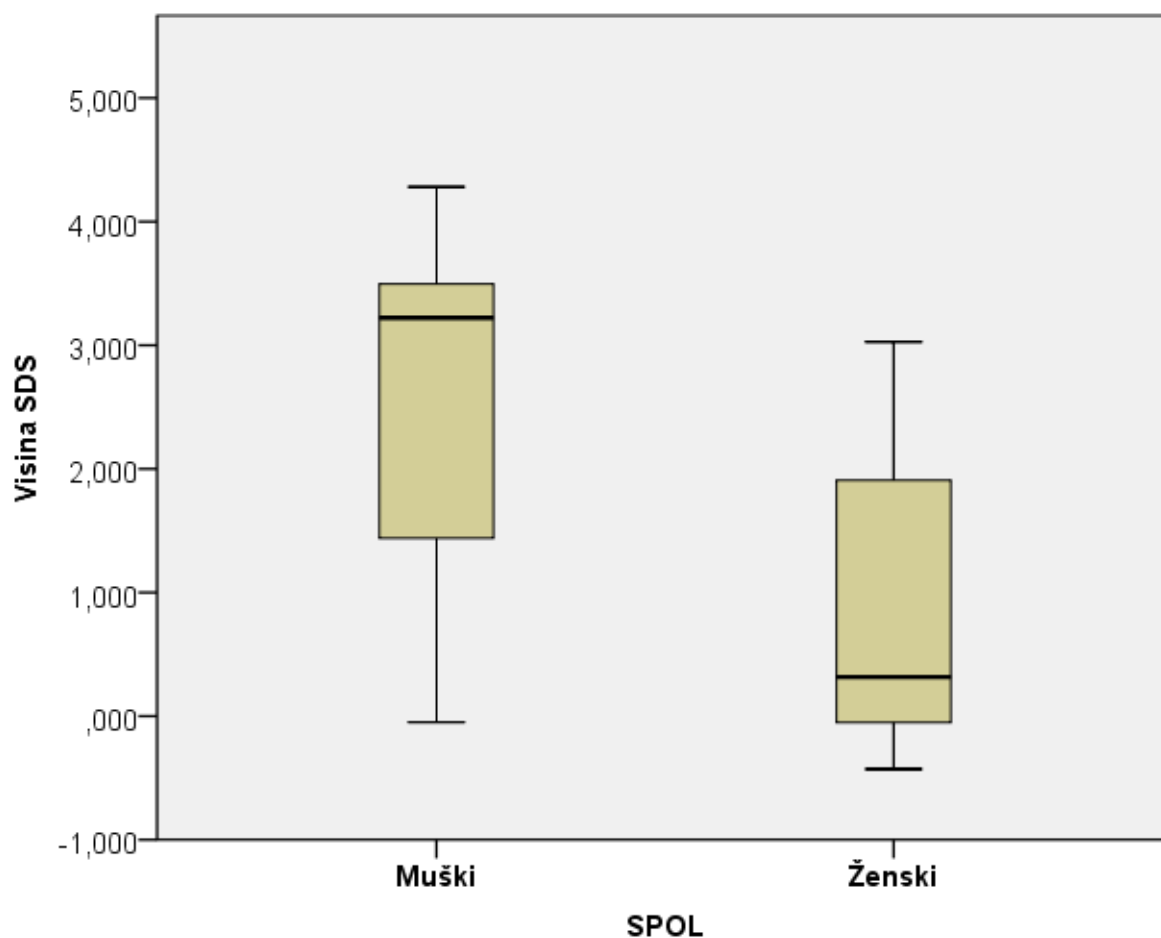
Tablica 4.1.6. Razlika dobi postavljanja dijagnoze, dobi pubarhe, odstupanja tjelesne visine u odnosu na prosječnu visinu za dob i odstupanje koštane dobi u odnosu na kronološku dob u skupini bolesnika s neklasičnom kongenitalnom adrenalnom hiperplazijom obzirom na spol ispitanika (za utvrđivanje razlike korišten je Mann-Whitney U test)

SPOL		N	Aritmetička sredina	SD	Min	Max	Percentila		
							25.	50. (Medijan)	75.
<b>Dob dijagnoze<sup>1</sup></b>	Muški	18	18,88	12,63	0,38	38,00	7,83	13,46	32,00
	Ženski	31	13,12	12,05	0,01	55,00	5,50	8,17	18,00
<b>Dob pubarhe<sup>1</sup></b>	Muški	7	8,50	1,23	6,98	10,00	7,00	8,50	9,50
	Ženski	13	6,24	1,14	4,50	8,00	5,04	6,50	7,25
<b>Visina SDS</b>	Muški	6	2,60	1,60	-0,05	4,28	1,07	3,22	3,69
	Ženski	13	0,90	1,23	-0,43	3,03	-0,06	0,32	2,19
<b>Koštana-kronološka dob</b>	Muški	4	2,05	0,98	1,00	3,33	1,18	1,94	3,04
	Ženski	9	2,56	1,23	0,66	4,00	1,34	2,92	3,63
		Mann-Whitney U	Z	p					
<b>Dob dijagnoze<sup>1</sup></b>		187,500	-1,899	0,058					
<b>Dob pubarhe<sup>1</sup></b>		9,500	-2,862	<u>0,004</u>					
<b>Visina SDS</b>		13,000	-2,280	<u>0,023</u>					
<b>Koštana-kronološka dob</b>		13,000	-,772	0,440					

<sup>1</sup> – dob je izražena u godinama, N – broj ispitanika, SD – standardna devijacija, Min – najniža vrijednost, Max – najviša vrijednost, SDS – *standard deviation score*; podcrtane su varijable u kojih je nađena statistički značajna razlika



Slika 4.1. Razlike u dobi pojave pubarhe obzirom na spol ispitanika u skupini bolesnika s neklasičnim oblikom kongenitalne adrenalne hiperplazije - Box i Whiskerov plot. Djevojčica s neklasičnim oblikom kongenitalne adrenalne hiperplazije imale su statistički značajno raniju dob pojave pubarhe u odnosu na muške ispitanike ( $p=0,004$ ).



Slika 4.2. Razlike u odstupanju tjelesne visine u odnosu na prosječnu visinu za dob obzirom na spol ispitanika u skupini bolesnika s neklasičnim oblikom kongenitalne adrenalne hiperplazije - Box i Whiskerov plot. Dječaci s neklasičnim oblikom kongenitalne adrenalne hiperplazije statistički su značajno viši u odnosu na prosječnu visinu za dob prilikom postavljanja dijagnoze u odnosu na djevojčice s neklasičnim oblikom kongenitalne adrenalne hiperplazije ( $p=0,023$ ).

U skupini ispitanika s NKKAH-om, statistički je značajno više bolesnica s NKKAH-om imalo simptome hiperandrogenizma u odnosu na muške ispitanike (muški ispitanici: 44,4%, ženske ispitanice 90,3%,  $X^2=12,297$ ,  $p<0,001$ ) (Tablica 4.1.7. i Slika 4.3.).

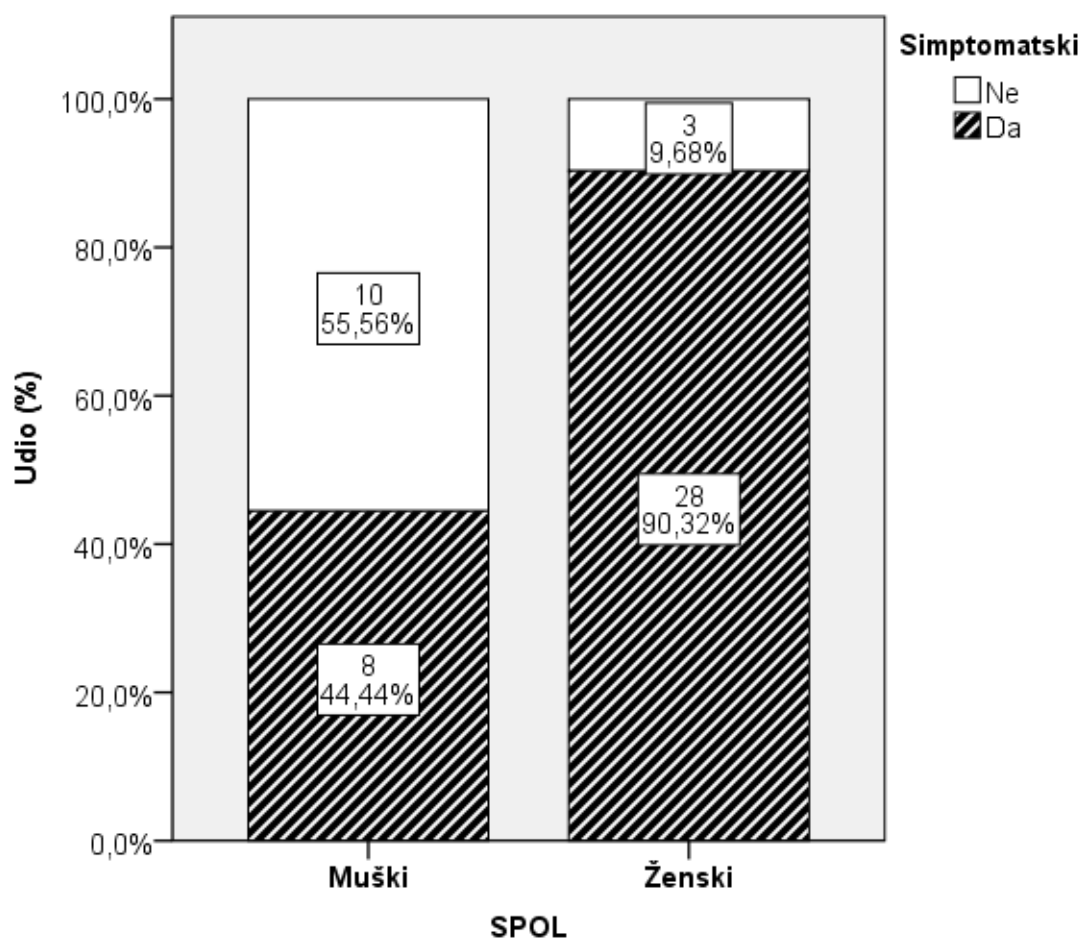
Tablica 4.1.7. Razlika u udjelu simptomatskih i asimptomatskih bolesnika s neklasičnim oblikom kongenitalne adrenalne hiperplazije obzirom na spol ispitanika (za utvrđivanje razlike korišten je  $X^2$  test).

SPOL			Simptomatski		Ukupno
			Ne	Da	
<b>Muški</b>	<b>N</b>		10	8	18
	<b>%</b>		55,6	44,4	100,0
<b>Ženski</b>	<b>N</b>		3	28	31
	<b>%</b>		9,7	90,3	100,0
<b>Ukupno</b>	<b>N</b>		13	36	49
	<b>%</b>		26,5	73,5	100,0

	Vrijednost	df	P	P (2-sided)	Egzaktni P (1-sided)
<b>Pearsonov hi-kvadrat test</b>	12,297 <sup>a</sup>	1	<b>&lt;0,001</b>		
<b>Fisherov egzaktni test</b>				<b>0,001</b>	<b>0,001</b>
<b>Broj ispitanih varijabli</b>	49				

N – broj ispitanika



Slika 4.3 Učestalost simptomatskih bolesnika među ispitanicima s nekласičnim oblikom kongenitalne adrenalne hiperplazije obzirom na spol ispitanika.

#### 4.1.5. Fertilitet u bolesnika s NKKAH-om

Podaci o fertilitetu bili su dostupni za 18 od 24 bolesnika generativne dobi. Među njima, 16 ispitanika (8 muškaraca i 8 žena) ima djecu (#8, #10, #11, #12, #13, #25, #26, #29, #32, #33, #34, #35, #37, #42, #44), a dva bolesnika (#9 i #43) za sada nisu pokušali ostvariti potomstvo. Bolesnici #6, #20, #21, #22, #40 i #41 su tijekom praćenja dosegli generativnu dob, ali podaci o fertilitetu nisu poznati (Tablica 4.1.8.)

Svih osam muških bolesnika i šest od osam ženskih bolesnica koji imaju djecu otkriveni su analizom članova obitelji nakon postavljanja sumnje na hipersekreciju androgena

u njihovog djeteta. Bolesnice #10 i #29 otkrivene su zbog simptoma hipersekrecije androgena.

Niti jedan muški ispitanik nije imao problem neplodnosti, a trudnoće u svih ženskih ispitanica su bile spontane. Bolesnice #12, #13 i #26 imaju poremećaj menstrualnog ciklusa (oligomenoreja), a bolesnice #11 i #12 imale su poteškoće začeća (bolesnica #11 samo u prvoj trudnoći). U našoj skupini ispitanica niti jedna bolesnica nije imala spontani pobačaj.

Ukupno je rođeno 26 djece, od toga je 14 oboljelih od KAH-e (sedmero djece su gubiaci soli, troje ima jednostavni virilizirajući oblik bolesti, a četvero djece ima NKKAH). Za bolesnicu #29 ishod trudnoće nije poznat, dok su ispitanici #11 i #33 supružnici i imaju zajedničku djecu. Veliki udio djece oboljele od KAH-e u ostvarenom potomstvu posljedica je pristranosti u izboru ispitanika, obzirom da je 87,5% ispitanika generativne dobi otkriveno analizom članova obitelji.



Tablica 4.1.8. Fertilitet u uzorku bolesnika generativne dobi s neklasičnim oblikom kongenitalne adrenalne hiperplazije

Redni broj bolesnika	Spol	Fertilitet	Djeca
8.	Ž	Spontana trudnoća s 23 godine. Nije imala poteškoće začeća. Pojačani hirzutizam i akne u trudnoći.	Žensko dijete; po porodu uočena klitoromegalija, obradom isključena KAH-a u djeteta i otkriven NKKAH u majke.
10.	Ž	Spontana trudnoća s 20 godina. Uzimala glukokortikoidnu terapiju do 17. godine.	Zdravo muško dijete.
11.	Ž	Spontana prva trudnoća s 25 godina nakon 6-7 mjeseci odnosa bez zaštite; druga trudnoća s 29 godina, bez poteškoća.	Dvoje djece; stariji sin ima klasični oblik KAH-e (jednostavni virilizirajući oblik), a mlađi sin ima NKKAH
12.	Ž	Neredovit menstrualni ciklus, poteškoće začeća, dvije spontane trudnoće.	Dvoje djece; jedan sin ima NKKAH, a u drugog sina nije učinjena obrada
13.	Ž	Oligomenoreja. Dvije spontane trudnoće, prva s 22 godine.	Dvoje djece; kćerka ima klasični oblik KAH-e (gubioc soli), a sin je zdrav.
25.	Ž	Tri spontane trudnoće, prva trudnoća s 25 godina.	Troje djece; sin ima klasični oblik KAH-e (gubioc soli), a dvije kćerke su zdrave.
26.	Ž	Oligomenoreja. Prva spontana trudnoća s 22 godine; glukokortikoidna terapija započeta u 12. tjednu gestacije i nastavljena nakon poroda.	Zdravo muško dijete.
29.	Ž	Prva spontana trudnoća u 31. godini, prethodno započeta glukokortikoidna terapija.	NP
32.	M	Fertilan u dobi od 26 godina, nije uzimao glukokortikoidnu terapiju.	Dvoje djece; sin ima klasični oblik KAH-e (jednostavni virilizirajući oblik), a kćerka je zdrava.
33.	M	Fertilan u dobi od 23 godina, nije uzimao glukokortikoidnu terapiju	Dvoje djece; sin i kćerka, oboje imaju klasični oblik KAH-e (gubioci soli).
34.	M	Fertilan u dobi od 19 godina, nije uzimao glukokortikoidnu terapiju	Troje djece; jedna kćerka ima NKKAH, a dvije kćerke su zdrave.
35.	M	Fertilan u dobi od 27 godina, nije uzimao glukokortikoidnu terapiju.	Dvoje djece; stariji sin ima klasični oblik KAH-e (jednostavni virilizirajući oblik), a mlađi sin ima NKKAH.
37.	M	Fertilan u dobi od 23 godina, nije uzimao glukokortikoidnu terapiju.	Žensko dijete s klasičnim oblikom KAH-e (gubioc soli).
42.	M	Fertilan u dobi od 27 godina, nije uzimao glukokortikoidnu terapiju.	Dvoje djece; kćerka ima klasični oblik KAH-e (gubioc soli), a sin je zdrav.
44.	M	Fertilan u dobi od 25 godina, nije uzimao glukokortikoidnu terapiju.	Dvoje djece; kćerka ima klasični oblik KAH-e (gubioc soli), a sin je zdrav.

Ž - ženski spol, M - muški spol; NP - nije poznato

## **4.2. Biokemijske osobine bolesnika s NKKAH-om, tipizacija HLA i analiza mutacija gena *CYP21A2***

Svim bolesnicima s NKKAH-om izmjerene su bazalne koncentracije 17-OHP, a u 41/49 (83,67%) bolesnika učinjen je i ACTH test, te izmjerene koncentracije 17-OHP 60 minuta nakon stimulacije. Bazalne koncentracije androstendiona određene su kod 39 (79,59%) bolesnika, a bazalne koncentracije testosterona kod 16 (32,65%) bolesnika. Tipizacija gena HLA učinjena kod 44 (89,79%) bolesnika. Analiza mutacija gena *CYP21A2* izvedena je kod 47 (95,92%) bolesnika, odnosno ukupno je ispitano 94 alela. Naime, dva bolesnika (#42 i #44) su preminula prije mogućnosti provođenja genske analize.

Kod 40 (85,10%) bolesnika testiranog za mutacije gena *CYP21A2*, mutacije su uočene na oba alela, a kod šest (12,77%) bolesnika nađena je samo jedna mutacija. Samo kod jednog bolesnika (2,13%) nije nađena niti jedna od 8 testiranih najčešćih mutacija gena *CYP21A2*.

### **4.2.1. Biokemijske osobine bolesnika s NKKAH-om**

Biokemijske osobine skupine bolesnika s NKKAH-om prikazane su u Tablici 4.2.1.

Tablica 4.2.1. Razine 17-hidroksiprogesterona bazalno i nakon testa stimulacije s adrenokortikotropnim hormonom (60-minutni test stimulacije s ACTH), bazalne razine androstendiona i testosterona, te podjela bolesnika u skupine prema vrsti mutacija kod ispitanika s neklasičnim oblikom kongenitalne adrenalne hiperplazije (N=49).

Bolesnik	Spol	17-OHP bazalno <sup>1</sup>	17-OHP nakon stimulacije <sup>1</sup>	$\Delta 4^1$	T <sup>1</sup>	Skupina
1.	Ž	23,00	209,00	4,00	NT	A
2.	Ž	25,68	75,70	5,64	NT	/
3.	Ž	30,50	75,70	2,95	NT	B
4.	Ž	51,26	75,70	2,61	0,77	B
5.	Ž	242,00	657,00	5,00	NT	B
6.	Ž	26,86	NT	9,48	NT	A
7.	Ž	11,00	NT	NT	NT	B
8.	Ž	59,68	71,23	32,37	5,10	/
9.	Ž	96,00	211,00	14,00	3,00	B
10.	Ž	60,84	424,90	35,95	NT	B
11.	Ž	64,80	74,40	29,01	8,50	B
12.	Ž	9,60	87,40	NT	NT	B
13.	Ž	29,20	69,70	NT	NT	B
14.	Ž	12,09	88,13	NT	NT	A
15.	Ž	41,90	60,60	19,00	4,20	B
16.	Ž	107,00	471,00	1,00	NT	B
17.	Ž	271,00	481,00	1,00	NT	B
18.	Ž	216,77	217,47	14,28	NT	B
19.	Ž	162,00	169,00	7,00	0,50	A
20.	Ž	95,00	185,40	NT	NT	B
21.	Ž	9,54	44,35	12,91	NT	B
22.	Ž	70,43	357,10	7,70	1,94	B
23.	Ž	23,60	104,00	25,00	2,10	A
24.	Ž	12,90	NT	1,80	0,50	A
25.	Ž	5,70	236,00	5,90	NT	B
26.	Ž	29,69	85,30	14,40	NT	B
27.	Ž	28,88	134,30	12,91	NT	B
28.	Ž	48,10	606,00	6,00	NT	B
29.	Ž	37,80	NT	34,90	17,10	A
30.	Ž	99,00	281,00	47,10	4,40	B
31.	Ž	145,00	NT	6,10	3,20	B
32.	M	56,62	256,90	16,58	20,10	/

33.	M	15,10	91,00	7,00	NT	B
34.	M	30,27	78,70	7,33	NT	B
35.	M	61,60	177,00	24,55	NT	A
36.	M	35,20	NT	NT	NT	A
37.	M	26,64	55,70	3,18	NT	C
38.	M	23,80	330,00	1,00	NT	/
39.	M	26,70	NT	16,90	2,80	/
40.	M	7,90	74,40	4,80	NT	B
41.	M	13,10	51,83	11,10	NT	B
42.	M	84,72	157,40	5,90	NT	/
43.	M	48,70	46,90	22,00	22,00	A
44.	M	70,23	158,60	20,20	NT	/
45.	M	60,00	NT	13,50	NT	B
46.	M	65,50	205,70	5,70	0,80	/
47.	M	10,99	59,90	3,20	2,34	/
48.	M	38,00	299,00	2,80	0,50	A
49.	M	9,50	60,00	6,30	1,60	A

Ž – ženski spol, M – muški spol, 17-OHP – 17-hidroksiprogesteron, Δ4 – androstendion, T – testosteron, <sup>1</sup> koncentracija hormona izražena je u nmol/l; <sup>2</sup> bolesnici su podijeljeni u 3 skupine ovisno o vrsti mutacija: A koji nose 2 «blage» mutacije gena *CYP21A2* («blaga/blaga»), B koji nose kombinaciju «blage» i «umjereno teške/ teške» mutacije («blaga/umjereno teška» ili «blaga/teška») i C koji nose «umjereno tešku» i/ili «tešku» mutaciju na oba alela gena; s «/» su označeni bolesnici kod kojih nisu nađene dvije mutacije gena *CYP21A2* te se stoga ne mogu svrstati u navedene skupine; NT – nije testirano.

Rezultati analize koncentracija 17-OHP bazalno i nakon stimulacije s ACTH obzirom na vrstu i broj uočenih mutacije gena *CYP21A2*, te rezultati analize koncentracija androstendiona i testosterona obzirom na spol ispitanika prikazani su u Tablici 4.2.2.

Srednja vrijednost bazalnih koncentracija 17-OHP izmjerena u svih 49 bolesnika je 57,78±59,33 nmol/l, a srednja vrijednost koncentracija 17-OHP nakon stimulacije s ACTH je 186,71±156,27 nmol/l (izmjerena u 41/49 bolesnika).

U bolesnika u kojih su dokazane obje mutacije gena *CYP21A2*, srednja vrijednost bazalnih koncentracija 17-OHP je 60,64±64,26 nmol/l (N=40), a nakon stimulacije s ACTH srednja vrijednost koncentracija 17-OHP je 187,50±167,92 nmol/l (N=34) (Slika 4.4. i Slika 4.5.).

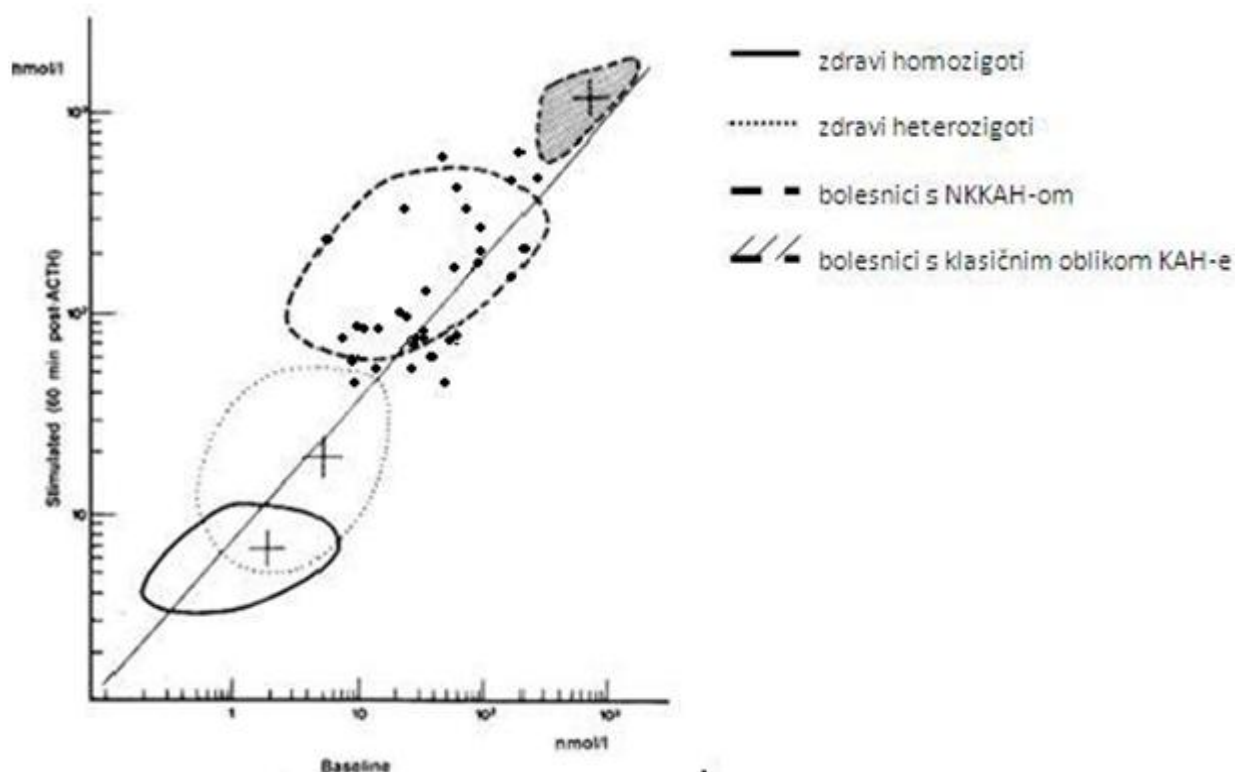
Tablica 4.2.2. Rezultati analize koncentracija 17-hidroksiprogesterona bazalno i nakon stimulacije s adrenokortikotropnim hormonom (60-minutni test stimulacije s ACTH) obzirom na vrstu i broj uočenih mutacije gena *CYP21A2*, te rezultati analize koncentracija androstendiona i testosterona obzirom na spol ispitanika kod skupine ispitanika s neklasičnim oblikom kongenitalne adrenalne hiperplazije.

Ispitivana varijabla <sup>1</sup>	Osobina skupine	Broj ispitanika	Srednja vrijednost ± standardna devijacija	Medijan	Min.	Max.
<b>bazalni 17-OHP</b>	svi	49	57,78±59,33	37,80	5,70	271,00
<b>17-OHP nakon stimulacije</b>	svi	41	186,71±156,27	134,30	44,35	657,00
<b>bazalni 17-OHP</b>	dviije mutacije gena <i>CYP21A2</i>	40	60,64±64,26	36,50	5,70	271,00
<b>17-OHP nakon stimulacije</b>	dviije mutacije gena <i>CYP21A2</i>	33	187,50±167,92	97,50	44,35	657,00
<b>bazalni 17-OHP</b>	jedna mutacija gena <i>CYP21A2</i>	6	34,88±21,24	26,19	10,99	65,50
<b>17-OHP nakon stimulacije</b>	jedna mutacija gena <i>CYP21A2</i>	5	185,64±116,42	205,70	59,90	330,00
<b>androstendion</b>	ženske ispitanice	26	13,77±12,67	8,59	1,00	47,10
<b>androstendion</b>	muški ispitanici	17	10,12±7,42	7,00	1,00	24,55
<b>testosteron</b>	ženske ispitanice	12	4,28±4,64	3,10	/	17,10

Min.- najmanja vrijednost; Max. – najveća vrijednost; 17-OHP – 17-hidroksiprogesteron;<sup>1</sup> sve koncentracije su izražene u nmol/l, «/» – nije relevantno

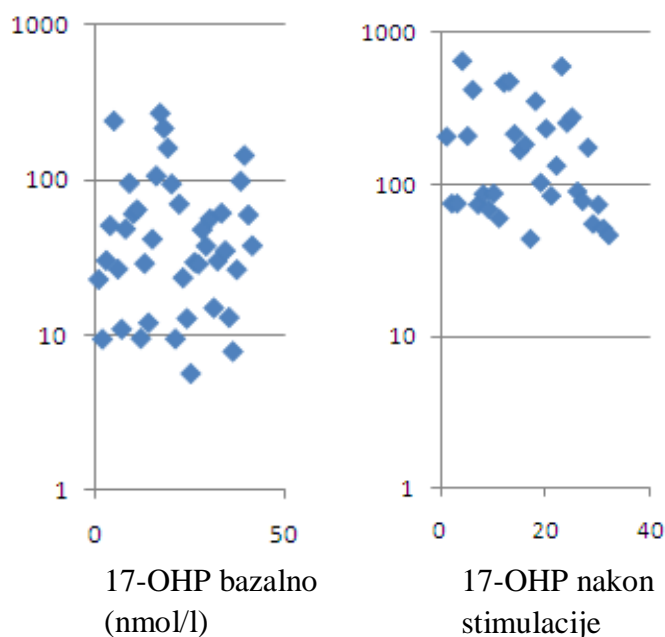
U bolesnice u koje nije dokazana niti jedna mutacija gena *CYP21A2* (#8) bazalna koncentracija 17-OHP je 59,68 nmol/l, a koncentracija 17-OHP nakon stimulacije je 71,23 nmol/l. Dva bolesnika preminula su prije provođenja genotipizacije (#42 i #44); njihove bazalne koncentracije 17-OHP su 84,72 i 70,23 nmol/l, a koncentracije 17-OHP nakon stimulacije 157,40 i 158,60 nmol/l.

U bolesnika u kojih su dokazane obje mutacije gena *CYP21A2*, samo jedna bolesnica (#25) je imala bazalnu koncentraciju 17-OHP nižu od 6 nmol/l. Nakon stimulacije s ACTH, u jedne bolesnice je koncentracija 17-OHP bila u rasponu od 30 - 45 nmol/l (#21), 4 bolesnika imalo je koncentracije 17-OHP u rasponu od 45 - 60 nmol/l, 10 bolesnika u rasponu od 60 – 90 nmol/l, a u 18 bolesnika koncentracije su više od 90 nmol/l. Najniža izmjerena koncentracija 17-OHP nakon stimulacije u našoj skupini ispitanika bila je 44,35 nmol/l.



Slika 4.4. Koncentracije 17-hidroksiprogesterona bazalno i nakon stimulacije s adrenokortikotropnim hormonom (60-minutni test stimulacije s ACTH) u 33/49 bolesnika s neklasičnim oblikom kongenitalne adrenalne hiperplazije u kojih je učinjen ACTH test i dokazane obje mutacije gena *CYP21A2*, prikazane u obliku standardiziranog nomograma prema New et al. (75).

NKKAH – neklasični oblik kongenitalne adrenalne hiperplazije, KAH – kongenitalna adrenalna hiperplazija



Slika 4.5. Prikaz bazalnih koncentracija 17-hidroksiprogesterona i koncentracija 17-hidroksiprogesterona nakon stimulacije s adrenokortikotropnim hormonom (60-minutni test stimulacije s ACTH) u bolesnika s neklasičnim oblikom kongenitalne adrenalne hiperplazije u kojih su dokazane dvije mutacije gena *CYP21A2*.

#### 17-OHP – 17-hidroksiprogesteron

Srednja vrijednost bazalnih koncentracija 17-OHP u simptomatskih bolesnika (N=36) je  $56,85 \pm 56,14$  nmol/l, medijan 37,9 nmol/l, a u asimptomatskih bolesnika (N=13)  $61,76 \pm 68,98$  nmol/l, medijan 35,20 nmol/l. Srednja vrijednost koncentracija 17-OHP nakon stimulacije s ACTH u simptomatskih bolesnika (N=30) je  $187,27 \pm 156,41$  nmol/l, medijan 151,65 nmol/l, a u asimptomatskih bolesnika (N=12)  $172,69 \pm 161,78$  nmol/l, medijan 84,85 nmol/l.

Između skupina simptomatskih i asimptomatskih bolesnika nije nađena statistički značajna razlika u koncentracijama 17-OHP bazalno i nakon stimulacije s ACTH (značajnost razlike ispitana je Mann-Whitney U testom) (Tablica 4.2.3.).



Tablica 4.2.3. Razlike u koncentracijama 17-hidroksiprogesterona bazalno i nakon stimulacije s adrenokortikotropnim hormonom (60-minutni test stimulacije s ACTH) između simptomatskih i asimptomatskih bolesnika s neklasičnim oblikom kongenitalne adrenalne hiperplazije.

Simptomatski		N	Aritmetička sredina	SD	Min	Max	Percentila		
							25.	50. (Medijan)	75.
17-OHP bazalno	Ne	13	61,76	68,98	7,90	271,00	25,22	35,20	77,48
	Da	36	56,85	56,14	5,70	242,00	23,15	37,90	65,33
17-OHP stimulirani	Ne	12	172,69	161,78	46,90	481,00	60,38	84,85	287,15
	Da	30	187,27	156,41	34,90	657,00	73,61	151,65	241,23

	Mann-Whitney U	Z	P
17 OHP bazalno	221,00	-0,29	0,768
17 OHP stimulirani	157,50	-0,63	0,531

N – broj ispitanika, SD – standardna devijacija, Min – najniža vrijednost, Max – najviša vrijednost, 17-OHP – 17-hidroksiprogesteron

#### **4.2.2. Određivanje antigena/gena HLA-A,-B i -DR i analiza mutacija gena CYP21A2 u bolesnika s NKKAH-om**

Tipizacija antigena/gena HLA učinjena je u 44/49 bolesnika s NKKAH-om. Od njih, u dva bolesnika nije učinjena genotipizacija, to jest određivanje mutacija gena *CYP21A2*, u 6/44 bolesnika nađena je mutacija na samo jednom alelu, a u jedne bolesnice nije nađena niti jedna mutacija gena *CYP21A2* (Tablica 4.2.4.).

Tablica 4.2.4. Tipizacija gena HLA, mutacije gena *CYP21A2* i podjela bolesnika u skupine prema vrsti mutacija kod ispitanika s neklasičnim oblikom kongenitalne adrenalne hiperplazije (NKAH) (N=49)

Bolesnik	Spol	HLA <sup>1</sup>	Mutacije gena <i>CYP21A2</i>	Skupina <sup>2</sup>
1.	Ž	A*03,*24;B*14,*15;DRB1*01,*03	Ex7(V281L)/ Ex7(V281L)	A
2.	Ž	A3,33; B14,55; DR3,14	Ex7(V281L)/ N	/
3.	Ž	A26,-;B14,35; DR1,15	Int2/ Ex7 (V281L)	B
4.~	Ž	A33,26; B14,35; DR1,15	Int2/ Ex7 (V281L)	B
5.	Ž	A*02,*33; B*14,*35; DRB1*11,*16	Ex4 (I172N) / Ex7 (V281L)	B
6.	Ž	A9,33; B14,18; DR3,11	Ex7(V281L)/ Ex7(V281L)	A
7.	Ž	NT	Ex4 (I172N) / Ex7 (V281L)	B
8.	Ž	A2,26; B49,56; DR4,11	N/N	/
9.	Ž	A*02,*33; B*14,*39; DRB1*03,*13	Ex7(V281L)/ Int2	B
10.	Ž	A2,2; B18,44; DR11,16	Ex1(P30L)/ Ex4(I172N)	B
11.	Ž	A2,33; B14,52; DR3,14	Ex7(V281L)/ Ex8(R356W)	B
12.~	Ž	NT	Ex7(V281L) / Ex7 (V281L), Ex8(Q318X), Ex8(R356W)	B
13.	Ž	A28,33; B14,17; DR3,13	Ex7(V281L)/ Int2	B
14.	Ž	A2,33; B12,14; DR1,4	Ex7(V281L)/ Ex7(V281L)	A
15.	Ž	A*02,*03; B*14,*27; DRB1*01,*01	Ex 4(I172N) / Ex 7 (V281L)	B
16.~	Ž	A*02,*03; B*14,*27; DRB1*01,*01	Ex 4(I172N) / Ex 7 (V281L)	B
17.~	Ž	A*02,*03; B*14,*27; DRB1*01,*01	Ex 4(I172N) / Ex 7 (V281L)	B
18.	Ž	A*02,*03; B*51,*14; DRB1*01,*13	Ex1(P30L), Int2, Ex3 (del8bp E3) / Ex7(V281L)	B
19.	Ž	A*02,*33; B*14,*41; DRB1*03,*16	Ex7(V281L)/ Ex7(V281L)	A
20.	Ž	A3,33; B5,14; DR1,4	Ex4(I172N)/ Ex7(V281L)	B
21.	Ž	A2,33; B12,14; DR1,1	Int2/ Ex7(V281L)	B
22.	Ž	A2,33; B14,35; DR1,6	Ex4(I172N)/ Ex7(V281L)	B
23.	Ž	A*33,*33; B*14,*14; DRB1*01,*03	Ex7(V281L)/ Ex7(V281L)	A
24.	Ž	A*02,*33; B*14,*40; DRB1*01,*14	Ex7(V281L)/ Ex10(P453S)	A
25.	Ž	A2,32; B47,58; DR2,5	Int2/ Ex1(P30L)	B
26.	Ž	NT	Ex7(V281L)/ Ex8(R356W)	B
27.	Ž	A2,33; B12,14; DR1,13	Int2/ Ex7(V281L)	B
28.	Ž	A*25,*32; B*27,*44; DRB1*01,*11	Ex 7(V281L)/ Ex8(Q318X)Ex8(R356W)	B
29.	Ž	A*24,-, B*13,*47, DRB1*,-	Ex1(P30L)/ Ex1(P30L)	A
30.	Ž	NT	Int 2/Ex7 (V281L)	B
31.	Ž	A*02,*02; B*27,*44; DRB1*01,*03	Int2/Ex7(V281L)	B
32.	M	A3,25; B18,18; DR1,11	Ex4(I172N)/N	/
33.	M	A11,33; B14,53; DR1,6	Ex1(P30L), Int2 / Ex7(V281L)	B

34.~	M	A2,2; B18,50; DR7,11	Ex1(P30L)/ Int2	B
35.	M	A28, <b>33</b> ; B <b>14</b> ,18; DR <b>1</b> ,11	Ex7 (V281L)/ Ex1 (P30L)	A
36.~	M	NT	Ex7 (V281L)/ Ex1 (P30L)	A
37.	M	A3,11; B5,35; DR1,2	Ex4(I172N)/ Int2	C
38.	M	A*02,* <b>33</b> ; B* <b>14</b> ,*44; DRB1* <b>01</b> ,*04	Ex7(V281L)/ N	/
39.~	M	A*02,* <b>33</b> ; B* <b>14</b> ,*44; DRB1* <b>01</b> ,*04	Ex7(V281L)/ N	/
40.	M	A2,11; B18,35; DR2,5	Int2/ Ex1(P30L)	B
41.~	M	A2, <b>33</b> ; B12, <b>14</b> , DR <b>1</b> ,13	Ex7(V281L)/ Int2	B
42.	M	A9,11; B22,35; DR6,6	P	/
43.~	M	A* <b>33</b> ,* <b>33</b> ; B* <b>14</b> ,* <b>14</b> ; DRB1* <b>01</b> ,*03	Ex7(V281L)/ Ex7(V281L)	A
44.	M	A11,28; B5, <b>14</b> ; DR6,6	P	/
45.~	M	A*02,*02; B*27,*44; DRB1*01,*03	Int 2/Ex7 (V281L)	B
46.	M	A*11,* <b>33</b> ; B* <b>14</b> ,*55, DRB1* <b>01</b> , -	Ex7(V281L)/ N	/
47.~	M	A*11,* <b>33</b> ; B* <b>14</b> ,*55, DRB1* <b>01</b> , -	Ex7(V281L)/ N	/
48.	M	A* <b>33</b> ,* <b>33</b> ; B* <b>14</b> ,* <b>14</b> ; DRB1* <b>01</b> ,*15	Ex7(V281L)/ Ex7(V281L)	A
49.	M	A* <b>33</b> ,* <b>33</b> ; B* <b>14</b> ,* <b>14</b> ; DRB1*03,*03	Ex7(V281L)/ Ex7(V281L)	A

<sup>1</sup>antigeni HLA određeni su metodom mikrolimfocitotoksičnosti, a geni HLA molekularnom metodom lančane reakcije polimeraze i početnicama specifičnim za pojedini alel/gen HLA;

<sup>2</sup>bolesnici su podijeljeni u 3 skupine ovisno o vrsti mutacija: A koji nose dvije «blage» mutacije gena *CYP21A2* («blaga/blaga»), B koji nose kombinaciju «blage» i «umjereno teške/ teške» mutacije («blaga/umjereno teška» ili «blaga/teška») i C koji nose «umjereno tešku» i/ili «tešku» mutaciju na oba alela gena; sa «/» su označeni bolesnici kod kojih nisu nađene dvije mutacije gena *CYP21A2* te se stoga ne mogu svrstati u navedene skupine; ~srodni bolesnik, Ž – ženski spol, M – muški spol, N – mutacija za sada nije nađena, P- bolesnik je preminuo prije provođenja genotipizacije, Ex – egzon, Int – intron, NT – nije testirano

Antigen/gen HLA-B14 nađen je u 32/44 bolesnika (72,73%); četiri bolesnika bili su homozigoti za HLA-B14, te je stoga ova specifičnost nađena ukupno 36 puta. U jednog bolesnika s antigenom HLA-B14 nije učinjena analiza mutacija gena *CYP21A2*, odnosno nije moguće utvrditi radi li se o povezanosti s mutacijom u egzonu 7. U svih preostalih 31 bolesnika nađena je povezanost antigena/gena HLA-B14 s mutacijom u egzonu 7 (V281L) (Tablica 4.2.5.). Kao što možemo vidjeti, bolesnici koji su bili homozigoti za antigen/gen HLA-B14 imali su i na oba alela mutaciju u egzonu 7.

Mutacija u egzonu 7 (V281L) nađena je ukupno u 39 bolesnika, odnosno na 47 alela, budući da su osam bolesnika homozigoti za ovu mutaciju. Među njima, u 34 bolesnika učinjena je tipizacija HLA.

Od 47 alela na kojima je nađena mutacija u egzonu 7, 35/47 (74,47%) alela je povezano s HLA-B14.

Od 34 bolesnika koji su nosioci mutacije u egzonu 7 i u kojih je učinjena tipizacija HLA, u 31/34 (91,18%) bolesnika mutacija u egzonu 7 bila je povezana s HLA-B14.

Kombinacija antigena/gena, to jest haplotip HLA-B14,-DR1 nađena je u 23/44 (52,27%) bolesnika i kod svih (23/23; 100,0%) je bila povezana s mutacijom u egzonu 7.

Haplotip HLA-A33,-B14 nađen je u 25/44 (56,82%) bolesnika i u svih bolesnika (25/25; 100,0%) bio je povezan s mutacijom u egzonu 7. Od 34 bolesnika koji su nosioci mutacije u egzonu 7 i u kojih je učinjena tipizacija HLA, u 25/34 (73,53%) bolesnika mutacija u egzonu 7 bila je povezana s haplotipom HLA-A33,-B14.

Cijeli haplotip HLA-A33,-B14,-DR1 imalo je 17/44 (38,64%) bolesnika i u svih bolesnika (17/17, 100,0%) je bio povezan s mutacijom u egzonu 7.

Tablica 4.2.5. Raspodjela gena HLA među bolesnicima s neklasičnim oblikom kongenitalne adrenalne hiperplazije u kojih je učinjena tipizacija HLA.

HLA	Broj bolesnika (%) <sup>1</sup>	Broj bolesnika s mutacijom na egzonu 7 <sup>2</sup>
<b>-B14</b>	32 (72,73%)	31 <sup>3</sup> (91,18%)
<b>-B14,-DR1</b>	23 (52,27%)	23 (67,65%)
<b>-A33</b>	25 (56,82%)	25 (73,53%)
<b>-A33,-B14</b>	25 (56,82%)	25 (73,53%)
<b>-A33,-B14,-DR1</b>	17 (38,64%)	17 (50,0%)
<b>-B5</b>	5 (11,36%)	
<b>-B8</b>	0	
<b>-B16</b>	0	
<b>-B18</b>	6 (13,64%)	
<b>-B27</b>	6 (13,64%)	
<b>-B35</b>	7 (15,91%)	
<b>-B47</b>	2 (4,55%)	
<b>-DR3</b>	11 (25,00%)	
<b>-DR7</b>	1 (2,27%)	

1

N=44 (broj bolesnika u kojih je učinjena tipizacija HLA), <sup>2</sup> N=34 (broj bolesnika koji su nosioci mutacije u egzonu 7 i u kojih je učinjena tipizacija HLA), <sup>3</sup> u jednog bolesnika nije učinjena genotipizacija

Kako bi dobili bolji uvid u povezanost mutacije u egzonu 7 s genima HLA, a s obzirom da smo imali više bolesnika iz iste obitelji, unutar naše ispitivane skupine bolesnika s NKKAH-om izdvojili smo skupinu od 26 bolesnika u kojih je učinjena tipizacija HLA, koji su nosioci mutacije u egzonu 7 i koji nisu u međusobnom srodstvu. Iz obitelji u kojima se otkriveno više članova oboljelih od NKKAH-e, i koji su nosioci mutacije u egzonu 7, uključen je samo po jedan bolesnik. Povezanosti pojedinog antigena HLA i mutacije u egzonu 7 u skupini od 26 bolesnika prikazani su u Tablici 4.2.6.

Tablica 4.2.6. Povezanost specifičnosti HLA i haplotipova HLA s mutacijom u egzonu 7 u skupini nesrodnih bolesnika s neklasičnim oblikom kongenitalne adrenalne hiperplazije (N=26).

HLA	DA (%)	NE (%)	proporcija	Clopper-Pearsonov 95% CI	p	Wilsonov 95% CI	p
<b>-B14</b>	24 (92,31%)	2 (7,69%)	0,888889	0,708413 - 0,976473	<b>&lt; 0,0001</b>	0,719422 - 0,96148	<b>&lt; 0,0001</b>
<b>-B14,-DR1</b>	16 (61,54%)	10 (38,46%)	0,592593	0,387984 - 0,776103	0,4421	0,407267 - 0,754852	0,3449
<b>-A33</b>	20 (76,92%)	6 (23,08%)	0,769231	0,563525 - 0,91026	<b>0,0094</b>	0,579484 - 0,889662	<b>0,0059</b>
<b>-A33,-B14</b>	20 (76,92%)	6 (23,08%)	0,666667	0,460393 - 0,834812	0,1221	0,478248 - 0,813567	0,0872
<b>-A33,-B14,-DR1</b>	12 (46,15%)	14 (53,85%)	0,461538	0,265871 - 0,666292	0,4225	0,287559 - 0,645421	0,3506

DA – bolesnik ima ispitivani antigen; NE – bolesnik nema ispitivani antigen, CI – interval pouzdanost («confidence interval»)

U skupini nesrodnih ispitanika s NKKAH-om (N=26) koji su nosioci mutacije u egzonu 7, učestalost HLA-B14 ( $p < 0,0001$ ) i HLA-A33 ( $p < 0,01$ ) je statistički značajno veća, dok za ostale haplotipove HLA, iako su češći, nije potvrđena statistička značajnost (uz preduvjet da učestalost pojedinog biljega mora biti veća od 50% kako bi predstavljao značajnu povezanost s mutacijom u egzonu 7; za usporedbu su korišteni Clopper-Pearsonov i Wilsonov test).

Usporedili smo i učestalost antigena/gena HLA-A33, HLA-B14 i HLA-DR1 u skupini nesrodnih bolesnika s NKKAH-om (N=26) koji su nosioci mutacije u egzonu 7 s učestalošću tih specifičnosti HLA u skupini nesrodnih zdravih ispitanika (N=210) u Hrvatskoj (127) (Tablica 4.2.7.).

Učestalosti HLA-A33, HLA-B14 i HLA-DR1 statistički su značajno veće u skupini nesrodnih bolesnika s NKKAH-om ( $p < 0,0001$ ).

Tablica 4.2.7. Usporedba učestalosti HLA-A33, HLA-B14 i HLA-DR1 između skupine nesrodnih bolesnika s neklasičnim oblikom kongenitalne adrenalne hiperplazije (N=26) koji su nosioci mutacije u egzonu 7 i skupine nesrodnih zdravih ispitanika u Hrvatskoj (N=210).

Gen HLA-	NKKAH N=26 (proporcija)	Zdravi N=210 (proporcija)	razlika proporcija	95% interval pouzdanosti Miettinen	p
<b>B14</b>	92,3% (0,923077)	3.1% (0,033333)	0,889744	0,723402 - 0,951262	<b><u>0,0001</u></b>
<b>DR1</b>	61,5% (0,615385)	11.9% (0,119048)	0,496337	0,300282 - 0,663393	<b><u>&lt; 0,0001</u></b>
<b>A33</b>	76,9% (0,769231)	2.4% (0,02381)	0,745421	0,554094 - 0,868047	<b><u>&lt; 0,0001</u></b>

NKKAHH – nesrodni bolesnici s neklasičnim oblikom kongenitalne adrenalne hiperplazije koji su nosioci mutacije u egzonu 7, zdravi – zdravi nesrodni ispitanici iz Hrvatske

Od 40 bolesnika u kojih su dokazane obje mutacije gena *CYP21A2*, 31/40 (77,50%) bolesnika su «složeni heterozigoti» (engl. «*compound heterozygotes*»), odnosno nosioci dvije različite mutacije gena *CYP21A2* na oba alela, a 9/40 (22,50%) bolesnika su homozigoti, odnosno nosioci iste mutacije na oba alela.

Analiza gena *CYP21A2* nije učinjena u dva bolesnika (#42 i #44) koji su preminuli prije provođenja genotipizacije; u bolesnice #8 nije nađena niti jedna od osam ispitanih najčešćih mutacija gena *CYP21A2*, a u šest bolesnika nađena je samo jedna mutacija gena *CYP21A2*. Mutacije gena *CYP21A2* nisu nađene na 8/94, odnosno 8,51% ispitanih alela.

Bolesnici su podijeljeni u tri skupine ovisno o vrsti mutacija: skupinu A čine bolesnici koji nose dvije «blage» mutacije gena *CYP21A2* («blaga/blaga»), skupinu B bolesnici koji nose kombinaciju «blage» i «umjereno teške/teške» mutacije («blaga/umjereno teška» ili «blaga/teška»), a skupinu C bolesnici koji nose «umjereno tešku» i/ili «tešku» mutaciju na oba alela gena *CYP21A2*. Skupina A obuhvatila je 12 bolesnika (12/40; 30,0%), skupina B 27 bolesnika (27/40; 67,5%), a skupina C jednog bolesnika (1/40; 2,5%) (Tablica 4.2.4. i Tablica 4.2.8.).

Tablica 4.2.8. Raspodjela mutacija gena *CYP21A2* u bolesnika s neklasičnim oblikom kongenitalne adrenalne hiperplazije u kojih su dokazane mutacije na oba alela (N=40).

Mutacija	Broj bolesnika (N=40)		Broj alela (N=80)	
	N	%	N	%
Ex7 (V281L)	34	85,0	42	52,50
Ex1 (P30L)	7	17,5	8	10,00
Int2	14	35,0	14	17,50
Ex4 (I172N)	9	22,5	9	11,25
Ex8 (R356W)	2	5,0	2	2,50
Ex7(V281L), Ex8(R356W), Ex8 (Q318X)	1	2,5	1	1,25
Ex1(P30L), Ex3, Int2	1	2,5	1	1,25
Ex10 (P453S)	1	2,5	1	1,25
Ex8 (R356W), Ex8 (Q318X)	1	2,5	1	1,25
Ex1 (P30L), Int2	1	2,5	1	1,25

Ex – egzon, Int - intron

Unutar skupine od 40 bolesnika s NKKAH-om u kojih su nađene dvije mutacije gena *CYP21A2* izdvojena je skupina od 31 bolesnika koji nisu srodni. Iz obitelji u kojima se otkriveno više članova oboljelih od NKKAH-e, uključen je samo po jedan bolesnik. Raspodjela mutacija gena *CYP21A2* među 31 nesrodnim bolesnikom s NKKAH u kojih su dokazane obje mutacije gena *CYP21A2* prikazana je u Tablici 4.2.9.



Tablica 4.2.9. Raspodjela mutacija gena *CYP21A2* u nesrodnih bolesnika s neklasičnim oblikom kongenitalne adrenalne hiperplazije u kojih su dokazane mutacije na oba alela (N=31).

Mutacija	Broj bolesnika (N=31)		Broj alela (N=62)	
	N	%	N	%
<b>Ex7 (V281L)</b>	26	83,87	33	53,23
<b>Ex1 (P30L)</b>	5	16,13	6	9,68
<b>Int2</b>	10	32,26	10	16,13
<b>Ex4 (I172N)</b>	7	22,58	7	11,29
<b>Ex8 (R356W)</b>	2	6,45	2	3,23
<b>Ex1(P30L), Ex3, Int2</b>	1	3,23	1	1,61
<b>Ex10 (P453S)</b>	1	3,23	1	1,61
<b>Ex8 (R356W), Ex8 (Q318X)</b>	1	3,23	1	1,61
<b>Ex1 (P30L), Int2</b>	1	3,23	1	1,61

Ex – egzon, Int - intron

Najčešća mutacija među ispitanim nesrodnim bolesnicima s NKKAH-om u kojih su dokazane obje mutacije gena *CYP21A2* je mutacija u egzonu 7 (V281L) koja je nađena na 53,23% alela. Mutacija u egzonu 7 ujedno je i najčešća «blaga» mutacija. «Umjereno teška» mutacija na egzonu 4 (I172N) nađena je na 11,29% alela. Najčešća «teška» mutacija je mutacija introna 2, koja je nađena na 16,13% alela.

Usporedbom koncentracija 17-OHP bazalno i nakon stimulacije s ACTH u bolesnika u kojih su dokazane obje mutacije gena *CYP21A2* nije nađena statistički značajna razlika u koncentracijama 17-OHP bazalno i nakon stimulacije s ACTH između skupine bolesnika s dvije «blage» mutacije (skupina A) i bolesnika s jednom «blagom» i jednom «umjereno teškom/teškom» mutacijom (skupina B). Značajnost razlike ispitana je Mann-Whitney U testom (Tablica 4.2.10.).

Tablica 4.2.10. Usporedba razina 17-hidroksiprogesterona bazalno i nakon stimulacije s adrenokortikotropnim hormonom (60-minutni test stimulacije s ACTH) u bolesnika u kojih su dokazane obje mutacije gena *CYP21A2* obzirom na distribuciju mutacija.

Skupina		N	Aritmetička sredina	SD	Min	Max	Percentila		
							25.	50. (Medijan)	75.
17-OHP BAZALNO	A	12	40,94	41,14	9,50	162,00	15,43	31,03	46,03
	B	27	70,65	71,76	5,70	271,00	28,88	48,10	96,00
17-OHP STIMULIRANI	A	9	131,99	87,87	34,90	299,00	53,45	104,00	193,00
	B	24	213,80	187,32	44,35	657,00	74,73	112,65	338,08

	Mann-Whitney U	Z	P
17-OHP BAZALNO	121,00	-1,248	0,212
17-OHP STIMULIRANI	84,00	-0,970	0,332

N – broj bolesnika, SD – standardna devijacija, Min – najniža vrijednost, Max – najviša vrijednost, 17-OHP – 17-hidroksiprogesteron, A – bolesnici s dvije “blage” mutacije; skupina B – bolesnici s jednom „blagom” i jednom „umjereno teškom/teškom” mutacijom

#### **4.2.3. Odnos genotipa i fenotipa**

Bolesnici u kojih su nađene obje mutacije gena *CYP21A2* podijeljeni su u tri skupine ovisno o vrsti mutacija: skupinu A čini 12/40 bolesnika («blaga/blaga» mutacija), skupinu B 27/40 bolesnika («blaga/umjereno teška» ili «blaga/teška» mutacija, a skupinu C 1/40 bolesnika («umjereno teška» i/ili «teška» mutaciju na oba alela gena *CYP21A2*).

Očekivani fenotip u skupini A i B odgovara neklasičnom obliku KAH-e, dok bi u skupini C očekivani fenotip odgovarao klasičnom obliku bolesti (jednostavna virilizirajuća forma). U našoj skupini bolesnika stupanj povezanosti fenotipa i genotipa bio je 97,5%.

U skupini ispitanika s NKKAH-om nije nađena statistički značajna razlika između bolesnika koji nose dvije «blage» mutacije (skupina A) u odnosu na bolesnike koji nose jednu «blagu» i jednu «tešku/umjereno tešku» mutaciju (skupina B) obzirom na dob prilikom postavljanja dijagnoze, dob pubarhe, dob menarhe, odstupanje tjelesne visine u odnosu na prosječnu visinu za dob prilikom postavljanja dijagnoze, te odstupanje koštane u odnosu na kronološku dob (Tablica 4.2.11).

Tablica 4.2.11. Usporedba kliničkih karakteristika bolesnika s neklasičnim oblikom kongenitalne adrenalne hiperplazije u ovisnosti o vrsti mutacija. Značajnost razlike ispitana je Mann-Whitney U testom.

Skupina		N	Aritmetička sredina	SD	Min	Max	Percentila		
							25.	50. (Medijan)	75.
Dob dijagnoze	A	12	12,66	10,34	0,03	32,00	6,88	9,81	18,75
	B	27	14,82	13,23	0,01	55,00	5,50	10,42	18,00
Dob pubarhe	A	6	7,00	2,00	4,50	9,50	4,88	7,25	8,75
	B	9	6,62	1,07	5,00	8,00	5,54	7,00	7,50
Dob menarhe	A	4	13,02	3,12	10,42	17,00	10,48	12,33	16,25
	B	7	11,55	1,81	9,00	15,00	11,00	11,00	12,00
Visina SDS	A	6	0,62	1,11	-0,43	2,48	-0,15	0,13	1,70
	B	8	1,13	1,30	-0,08	3,03	-0,05	0,79	2,52
Koštana-kronološka dob	A	4	1,90	1,27	0,67	3,33	0,75	1,79	3,14
	B	6	2,82	1,27	0,66	4,00	1,67	3,25	3,81

	Mann-Whitney U	Z	P
Dob dijagnoze	160,50	-0,05	0,964
Dob pubarhe	23,50	-0,41	0,679
Dob menarhe	13,00	-0,19	0,849
Visina SDS	18,00	-0,77	0,439
Koštana-kronološka dob	7,00	-1,07	0,286

N – broj ispitanika, SD – standardna devijacija, Min – najniža vrijednost, Max – najviša vrijednost, skupina A – bolesnici s dvije «blage» mutacije; skupina B – bolesnici s jednom «blagom» i jednom «umjereno teškom/teškom» mutacijom, SDS – *standard deviation score*

### **4.3. Analiza članova obitelji bolesnika s NKKAH-om**

Klinička, biokemijska i molekularna analiza provedena je u skupini od 64 člana obitelji, i to u 46 roditelja (majka i/ili otac) bolesnika, 15 braće i sestara i troje djece bolesnika.

Bolesnici s klasičnim oblikom KAH-e koji su srodnici bolesnika s NKKAH-om (braća/sestre ili djeca bolesnika s NKKAH-om) nisu uključeni u daljnju analizu. U osam obitelji otkrivena su dva ili više članova oboljelih od NKKAH-e.

U svih 64 članova obitelji ispitana je prisutnost simptoma hiperandrogenizma. Samo u šest članova nađeni su simptomi koji mogu ukazivati na hipersekreciju androgena, i to u pet ženskih članova (tri majke i dvije sestre bolesnika) i u jednog muškog člana obitelji (otac bolesnika). U 3/5 simptomatskih ispitanika dokazano je da su heterozigoti za mutaciju gena *CYP21A2*, u 2/5 simptomatskih ispitanika nije učinjena genska analiza, iako porast koncentracije 17-OHP nakon stimulacije s ACTH odgovara heterozigotima, a jedna ispitanica sa simptomima hiperandrogenizma je zdravi homozigot.

Bazalne koncentracije 17-OHP i koncentracije 17-OHP 60 minuta nakon stimulacije sa sintetskim ACTH izmjerene su u 38/64 članova obitelji, a u 35/64 članova određene su bazalne koncentracije androstendiona. U 50/64 ispitanika učinjena je tipizacija HLA, a u 54/64 članova obitelji, odnosno na ukupno 108 alela, provedena je molekularna analiza gena *CYP21A2* (Tablica 4.3.1.).

Tablica 4.3.1. Kliničke osobine, razine 17-hidroksiprogesterona bazalno i nakon stimulacije s adrenokortikotropnim hormonom (60-minutni test stimulacije s ACTH), bazalne razine androstendiona, tipizacija HLA i mutacije gena *CYP21A2* u zdravih članova obitelji bolesnika s neklasičnim oblikom kongenitalne adrenalne hiperplazije (NKAH)

Bolesnik	Srodnik	Simptomi	17-OHP bazalno <sup>1</sup>	17-OHP nakon stimulacije <sup>1</sup>	$\Delta 4^1$	HLA <sup>2</sup>	Mutacija gena <i>CYP21A2</i>
1.	M	Jedan spontani pobačaj	2,10	19,00	2,00	A*02,*24; B*51,*62; DRB1*03,*15	NT
	O	-	2,60	9,20	7,70	A*03,*26; B*51,*65; DRB1*01,*11	NT
	S	Razvoj pubične i aksilarne dlakavosti s 11 godina, menarhe s 11 godina, redoviti ciklusi, pojačana dlakavost (FGS 15)	4,00	14,20	6,20	A *02,*26; B*51,*51; DRB1*11,*15	NT
2.	M	Anovulatorni ciklusi, pojačana dlakavost iznad gornje usne, poteškoće začeća (stimulacija ovulacije)	3,23	11,92	3,48	NT	Ex7(V281L)/N
	O	-	2,50	4,70	2,11	NT	NT
3. i 4.	M	-	NT	NT	NT	A1,26; B8,35; DR3,15	Int2/N
	O	-	NT	NT	NT	A31,33; B7,14; DR1,15	Ex7(V281L)/N
	S	-	NT	NT	NT	A1,31; B7,8; DR3,15	N/N
	B	-	NT	NT	NT	A1,33; B8,14; DR1,3	Ex7(V281L)/N
5.	M	Izraženija dlakavost, uredni menstrualni ciklusi	8,80	18,50	6,00	A*03,*33; B*35,*14; DRB1*14,*16	Ex7(V281L)/N
	O	-	0,40	6,10	10,00	A*0 2,*24; B*18,*35; DRB1*11,*11	Ex4(I172N)/N
	S	-	0,70	7,90	1,00	A*03,*24; B*18,*35; DRB1*11,*14	N/N

<b>6.</b>	M	-	1,42	14,26	5,02	A2,9; <b>B14</b> , -; DR3,15	Ex7(V281L)/N
	O	-	2,33	5,84	5,69	A2,9; B5,18; DR11,16	Ex7(V281L)/N
	B	-	NT	NT	NT	NT	N/N
<b>7.</b>	M	-	NT	NT	NT	NT	Ex4(I172N)/N
	O	-	NT	NT	NT	NT	Ex7(V281L)/N
<b>9.</b>	M	-	10,60	17,00	NT	A*02,*32; B*39,-; DRB1*13,-	Ex7(V281L)/N
	O	-	2,10	21,80	NT	A*23,*33;B*14,*51; DRB1*03,*12	Int2/N
	S	-	3,70	11,90	9,00	A*02,*23,B*39,*51,DRB1*12,*13	Int2/N
	B	-	5,90	8,100	13,00	A*23,*32; B*39,*51; DRB1*12,*13	N/N
<b>10.</b>	M	-	NT	NT	NT	A2,2; B18,44; DR16,16	Ex4(I172N)/N
<b>10. i 34.<sup>3</sup></b>	S/D	-	NT	NT	NT	A2,2; B18,50; DR7,16	NT
	S/D	-	NT	NT	NT	A2,2; B18,50; DR7,16	NT
<b>11.</b>	M	-	NT	NT	NT	NT	Ex8(356)/N
	O	-	NT	NT	NT	NT	Ex7(V281L)
<b>14.</b>	M	-	4,39	13,09	11,94	A2,-; B12,27; DR4,7	Ex7(V281L)/N
	O	-	4,87	16,98	8,62	A2,33; <b>B14</b> ,40; DR1,11	Ex7(V281L)/N
	S	-	2,07	6,78	0,78	A2,2; B12,40; DR7,11	N/N
<b>15., 16. i 17.</b>	M	-	8,70	15,30	15,00	A*03,*11; B*14,*40; DRB1*01,*04	Ex7 (V281L)
	O	Izražene akne u djetinjstvu, uz rezidualne ožiljkaste promjene	4,80	11,40	17,00	A*02,*03; B*27,*-; DRB1*01,*13	Ex 4 (I127N)/N
<b>18.</b>	M	-	10,26	18,94	9,27	A*03,*25; B*14,*18; DRB1*01,*01	Ex7(V281L)/N
	O	-	3,95	5,98	10,04	A*02,*25; B*07,*51; DRB1*13,*13	N/N
	S	-	NT	NT	NT	A*02,*03; B*14,*51; DRB1*01,*13	Ex7(V281L) /N
<b>19.</b>	M	-	NT	NT	NT	A*02,*03; B*35,*41; DRB1*01,*13	Ex7(V281L)/N
	O	-	NT	NT	NT	A*03,*33; B*14,*35; DRB1*11,*16	Ex7(V281L)/N
<b>20.</b>	M	-	NT	NT	NT	A3,9; B5,15; DR1,6	Ex4(I172N)/N

	O	-	NT	NT	NT	A9,33; B5,14; DR4,-	Ex7(V281L)/N
21. i	M	-	0,43	4,21	5,78	A28,33; B5,14; DR1,4	Ex7(V281L)/N
41.							
	O	-	2,09	5,51	10,20	A2,-; B12,13; DR7,13	Int2/N
22.	M	-	N/O	N/O	N/O	A2,33; B14,62; DR1,6	NT
23. i	M	-	1,90	11,30	6,00	A*02,*33; B*13,*14; DRB1*03,*13	Ex7(V281L)/N
43.							
	O	-	1,10	5,90	9,00	A*26,*33; B*14,*38; DRB1*01,*04	Ex7(V281L)/N
25.	D	-	NT	NT	NT	A2,2; B49,58; DR5,5	NT
28.	M	-	NT	NT	NT	NT	Ex8(Q318X)
							Ex8(R356W)/
							N
	O	-	NT	NT	NT	NT	Ex7(V281L)/N
	S	-	2,40	8,20	2,00	NT	N/N
30.	M	-	7,00	39,20	5,00	NT	Int2/N
	O	-	2,90	10,60	10,30	NT	Ex7(V281L)/N
	S	Hirzutizam	0,60	9,30	11,10	NT	N/N
31. i	M	-	NT	NT	NT	A*02,*03; B*35,*44; DRB1*01,*15	Int2/N
45.							
	O	-	NT	NT	NT	A*02,*03; B*27,*51; DRB1*01,*03	Ex7(V281L)/N
32.	D	-	NT	NT	NT	A2,25; B16,18; DR11,11	N/N
35.	O	-	NT	NT	NT	NT	Ex1(P30L)/N
38. i	M	-	1,60	13,30	5,00	A*02,*24; B*44,*51; DRB1*04,*11	N/N
39.							
	O	-	2,40	7,60	8,00	A*02,*33; B*38,*14; DRB1*01,*16	Ex7(V281L)/N
40.	M	-	4,00	9,00	NT	A2,3; B18,27; DR5,-	NT
44.	D	-	NT	NT	NT	A2,28; B14,27; DR1,6	NT
48.	M	-	0,70	8,40	3,70	A*01,*11; B*08,*14; DRB1*01,*04	Ex7(V281L)/N



	O	-	3,70	10,00	6,90	A*02,* <b>33</b> ; B*08,* <b>14</b> ; DRB1*13,15	Ex7(V281L)/N
	S	-	4,30	27,50	4,20	A*01,* <b>33</b> ; B*08,* <b>14</b> ; DRB1*04,*15	Ex7(V281L)/N
<b>49.</b>	M	-	5,10	5,20	5,30	A*11,* <b>33</b> ; B*55,* <b>14</b> ; DRB1* <b>01</b> ,*03	Ex7(V281L)/N
	O	-	3,10	18,50	4,00	A*01,* <b>33</b> ; B*35,* <b>14</b> ; DRB1*03,*14	Ex7(V281L)/N
	S	-	1,80	11,20	1,80	A*01,* <b>33</b> ; B*35,* <b>14</b> ; DRB1* <b>01</b> ,*14	Ex7(V281L)/N

17-OHP – 17-hidroksiprogesteron,  $\Delta$ 4- androstendion, M - majka, O - otac, S - sestra; B -brat; D - dijete, FGS - Ferriman-Gallway score; NT - nije testirano, «-» - nema simptoma, N - nema mutacije, Ex – egzon, Int – intron

<sup>1</sup> koncentracije su izražene u nmol/l; <sup>2</sup>antigeni HLA određeni su metodom mikrolimfocitotoksičnosti, a geni HLA molekularnom metodom lančane reakcije polimeraze i početnicama specifičnim za pojedini alel/gen HLA;<sup>3</sup> bolesnica 10 i bolesnik 34 su kćerka i otac

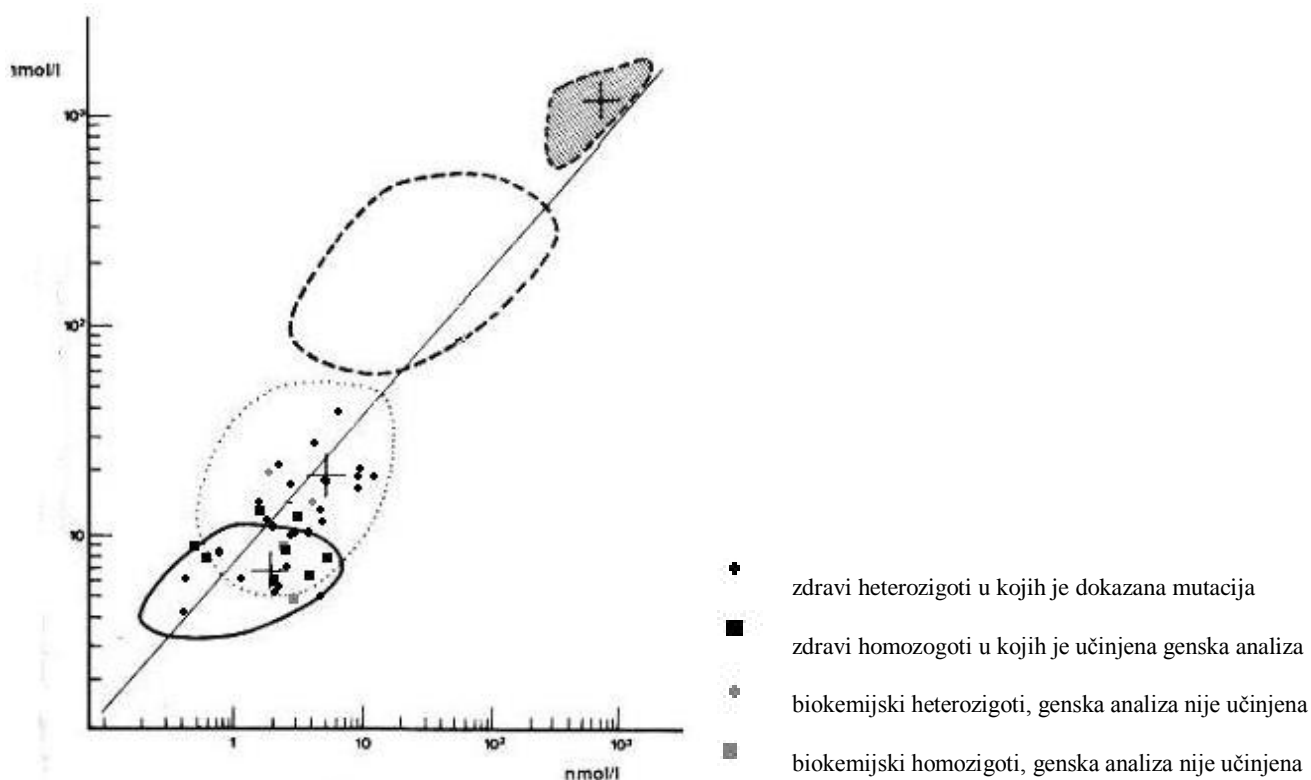
Koncentracije 17-OHP bazalno i nakon stimulacije s ACTH izmjerene su u 33 člana obitelji u kojih je učinjena analiza mutacija gena *CYP21A2*, od toga u 7 zdravih homozigota i 26 heterozigota (dokazanih analizom mutacija gena *CYP21A2*) (Tablica 4.3.2. i Slika 4.6.).

Tablica 4.3.2. Rezultati analize koncentracija 17-hidroksiprogesterona bazalno i nakon stimulacije s adrenokortikotropnim hormonom (60-minutni test stimulacije s ACTH) obzirom na prisutnost mutacija gena *CYP21A2*, te rezultati analize koncentracija androstendiona obzirom na spol ispitanika kod članova obitelji bolesnika s neklasičnim oblikom kongenitalne adrenalne hiperplazije.

Ispitivana varijabla <sup>1</sup>	Osobina skupine	Broj ispitanika	Srednja vrijednost ± standardna devijacija	Medijan	Min.	Max.
<b>bazalni 17-OHP</b>	zdravi homozigoti	6	2,53±3,07	2,00	0,60	5,90
<b>17-OHP nakon stimulacije</b>	zdravi homozigoti	6	8,80±2,45	8,15	5,98	13,30
<b>bazalni 17-OHP</b>	heterozigoti	27	3,86±2,90	3,10	0,40	10,60
<b>17-OHP nakon stimulacije</b>	heterozigoti	27	13,15±7,76	11,40	4,21	39,20
<b>androstendion</b>	ženske ispitanice, heterozigoti	14	6,54±3,58	5,54	/	/
<b>androstendion</b>	muški ispitanici, heterozigoti	10	8,97±3,49	8,81	/	/

Min.- najmanja vrijednost; Max. – najveća vrijednost; 17-OHP – 17-hidroksiprogesteron; <sup>1</sup> sve koncentracije su izražene u nmol/l, «/» – nije relevantno

U jednog heterozigota (majka bolesnice #30), koja je nosioc teške mutacije gena *CYP21A2* u intronu 2, koncentracija 17-OHP nakon stimulacije s ACTH bila je viša od 30 nmol/l (39,20 nmol/l); u svih ostalih ispitanika bila je niža od 30 nmol/l, što je prema New et al. (1983) biokemijski kriterij razlikovanja heterozigota i bolesnika s NKKAH-om.



Slika 4.6. Koncentracije 17-hidroksiprogesterona bazalno i nakon stimulacije s adrenokortikotropnim hormonom (60-minutni test stimulacije s ACTH) u svih članova obitelji bolesnika s neklasičnim oblikom kongenitalne adrenalne hiperplazije prikazane u obliku standardiziranog nomograma prema New et al (75).

Tipizacija HLA učinjena je u 50/64 ispitanika. Mutacija u egzonu 7 (V281L) nađena je kod 24 heterozigota u kojih je učinjena i tipizacija HLA. Kod 19/24 ispitanika (79,17%) nađena je povezanost mutacije V281L s antigenom HLA-B14, u 11/24 ispitanika (45,83%) povezanost s haplotipom HLA-B14,-DR1, u 16/24 ispitanika (66,67%) povezanost s haplotipom HLA-A33,-B14, a u 8/24 ispitanika (33,33%) povezanost s haplotipom HLA-A33,-B14,-DR1.

Molekularna analiza gena *CYP21A2* provedena je kod 41 roditelja bolesnika s NKKAH-om. Obzirom na autosomno-recesivnu prirodu nasljeđivanja bolesti, roditelji su obligatni nosioci barem jedne mutacije gena *CYP21A2*. Jedna mutacija potvrđena je u 95,12% (39/41) ispitanih roditelja. U dva roditelja, međutim, nije nađena niti jedna mutacija gena *CYP21A2*, i to u majke bolesnika #38 i #39 i u oca bolesnice #18. Kod bolesnika #38 i

#39, koji su braća i HLA identični, nađena je samo jedna mutacija gena *CYP21A2*, koja je prisutna i kod njihovog oca.

Kod bolesnice #18 jedna mutacija je naslijeđena od majke (egzon 7, V281L), a kombinacija mutacija na drugom alelu (egzon 1 (P30L)/intron 2/egzon 3 (del8bpE3)) nastala je *de novo* (tipizacijom HLA potvrđeno je očinstvo). Iz tog razloga njena sestra koja joj je HLA identična nije bolesnik, već nosi samo mutaciju naslijeđenu od majke (egzon 7, V281L).

Od 12 braće i sestara bolesnika s NKKAH-om u kojih je učinjena analiza mutacija gena *CYP21A2*, 41,67% (5/12) su heterozigoti, odnosno nosioci jedne mutacije gena *CYP21A2*, a 58,33% (7/12) su zdravi homozigoti.

Najčešća mutacija među ispitanim članovima obitelji je mutacija u egzonu 7 (V281L) koja je nađena u 65,90% heterozigota. «Umjereno teška» mutacija u egzonu 4 (I172N) nađena je u 11,36% heterozigota, a najčešća «teška» mutacija je mutacija intron 2 (656 A/C>G), koja je nađena u 13,60% heterozigota. (Tablica 4.3.3.). Kod jednog člana obitelji (majka bolesnice #28) našli smo dvije mutacije, ali na istom genu.

Tablica 4.3.3. Raspodjela mutacija gena *CYP21A2* među zdravim članovima obitelji bolesnika s neklasičnim oblikom kongenitalne adrenalne hiperplazija u kojih je dokazana mutacija/mutacije na jednom genu *CYP21A2* (N=44)

Mutacija	Broj ispitanika (N=44)	%
Ex7 (V281L)	30	68,2
Ex1 (P30L)	1	2,3
Int2	6	13,6
Ex4 (I172N)	5	11,3
Ex8 (R356W)	1	2,3
Ex8 (R356W), Ex8 (Q318X)	1	2,3

Ex – egzon, Int – intron

Među heterozigotima u kojih su izmjerene koncentracije 17-OHP bazalno i nakon stimulacije s ACTH, 20 ispitanika su nosioci «blage» mutacije gena *CYP21A2*, a 6 ispitanika su nosioci «umjereno teške» ili «teške» mutacije.

Usporedbom koncentracija 17-OHP bazalno i nakon stimulacije s ACTH među heterozigotima nije nađena statistički značajna razlika između koncentracija 17-OHP bazalno ( $p=0,793$ ), kao niti nakon stimulacije ( $p=0,726$ ) između heterozigota koji su nosioci jedne «blage» mutacije u usporedbi s heterozigotima koji nose jednu «tešku» ili «umjereno tešku» mutaciju gena *CYP21A2* (Tablica 4.3.4).

Tablica 4.3.4. Razlike u koncentracijama 17-hidroksiprogesterona bazalno i nakon stimulacije s adrenokortikotropnim hormonom (60-minutni test stimulacije s ACTH) između heterozigota u ovisnosti o vrsti mutacije (heterozigotni nosioci «blage» mutacije u odnosu na nosioce «umjereno teške/teške» mutacije). Značajnost razlike ispitana je Mann-Whitney U testom.

Mutacija		N	Aritmetička sredina	SD	Min	Max	Percentila		
							25.	50. (Medijan)	75.
17-OHP BAZALNO	Blaga mutacija	20	4,00	3,08	0,43	10,60	1,85	3,10	4,99
	Teška <sup>1</sup> mutacija	6	3,35	2,34	0,40	7,00	1,67	2,90	5,35
17-OHP STIMULIRANI	Blaga mutacija	20	12,33	5,86	4,21	27,50	7,19	11,30	16,99
	Teška <sup>1</sup> mutacija	6	15,99	12,79	5,51	39,20	5,95	11,65	26,15

	Mann-Whitney U	Z	P
17-OHP BAZALNO	58,50	-0,26	0,793
17-OHP STIMULIRANI	57,00	-0,35	0,726

N-broj ispitanika; SD- standardna devijacija; Min - najniža vrijednost; Max - najviša vrijednost; 17-OHP - 17-hidroksiprogesteron; <sup>1</sup>«teška mutacija» podrazumijeva «umjereno tešku» i «tešku» mutaciju

#### **4.4. Razlike koncentracija 17-OHP bazalno i nakon stimulacije s ACTH između bolesnika s NKKAH-om, heterozigota i zdravih homozigota. Analiza osjetljivosti i specifičnosti izmjerenih koncentracija 17-OHP bazalno i nakon stimulacije s ACTH kod bolesnika s NKKAH-om i zdravih ispitanika**

##### ***4.4.1. Razlike koncentracija 17-OHP bazalno i nakon stimulacije s ACTH između bolesnika s NKKAH-om, heterozigota i zdravih homozigota***

U bolesnika s NKKAH-om u kojih su nađene dvije mutacije gena *CYP21A2*, heterozigota i homozigota (potvrđenih genotipizacijom) ispitane su razlike koncentracije 17-OHP bazalno i nakon stimulacije s ACTH. Značajnost razlike ispitana je Kruskal-Wallis testom, a potvrđena post-hoc testiranjem Mann-Whitney U testom (Tablica 4.4.1. i Tablica 4.4.2.).

Tablica 4.4.1. Razlike koncentracija 17-hidroksiprogesterona bazalno i nakon stimulacije s adrenokortikotropnim hormonom (60-minutni test stimulacije s ACTH) u bolesnika s neklasičnim oblikom kongenitalne adrenalne hiperplazije (u kojih su nađene obje mutacije gena *CYP21A2*), heterozigota i homozigota (potvrđenih genotipizacijom) (Kruskal-Wallis test)

							Percentila		
		N	Aritmetička sredina	SD	Min	Max	25.	50. (Medijan)	75.
17-OHP BAZALNO	Bolesnici	40	60,64	64,26	5,70	271,00	23,15	36,50	69,52
	Zdravi hetrozigoti	27	3,86	2,90	0,40	10,60	1,90	3,10	4,87
	Zdravi homozigoti	6	2,53	2,07	0,60	5,90	0,68	2,00	4,44
17-OHP STIMULIRANI	Bolesnici	34	187,50	167,92	34,90	657,00	73,23	97,50	247,25
	Zdravi hetrozigoti	27	13,15	7,76	4,21	39,20	6,78	11,40	17,00
	Zdravi homozigoti	6	8,80	2,45	5,98	13,30	7,42	8,15	10,30

	Hi-kvadrat	df	P
17-OHP BAZALNO	51,190	2	<0,001
17-OHP STIMULIRANI	49,694	2	<0,001

N - broj ispitanika; SD - standardna devijacija; Min - najniža vrijednost; Max - najviša vrijednost; 17-OHP - 17-hidroksiprogesteron

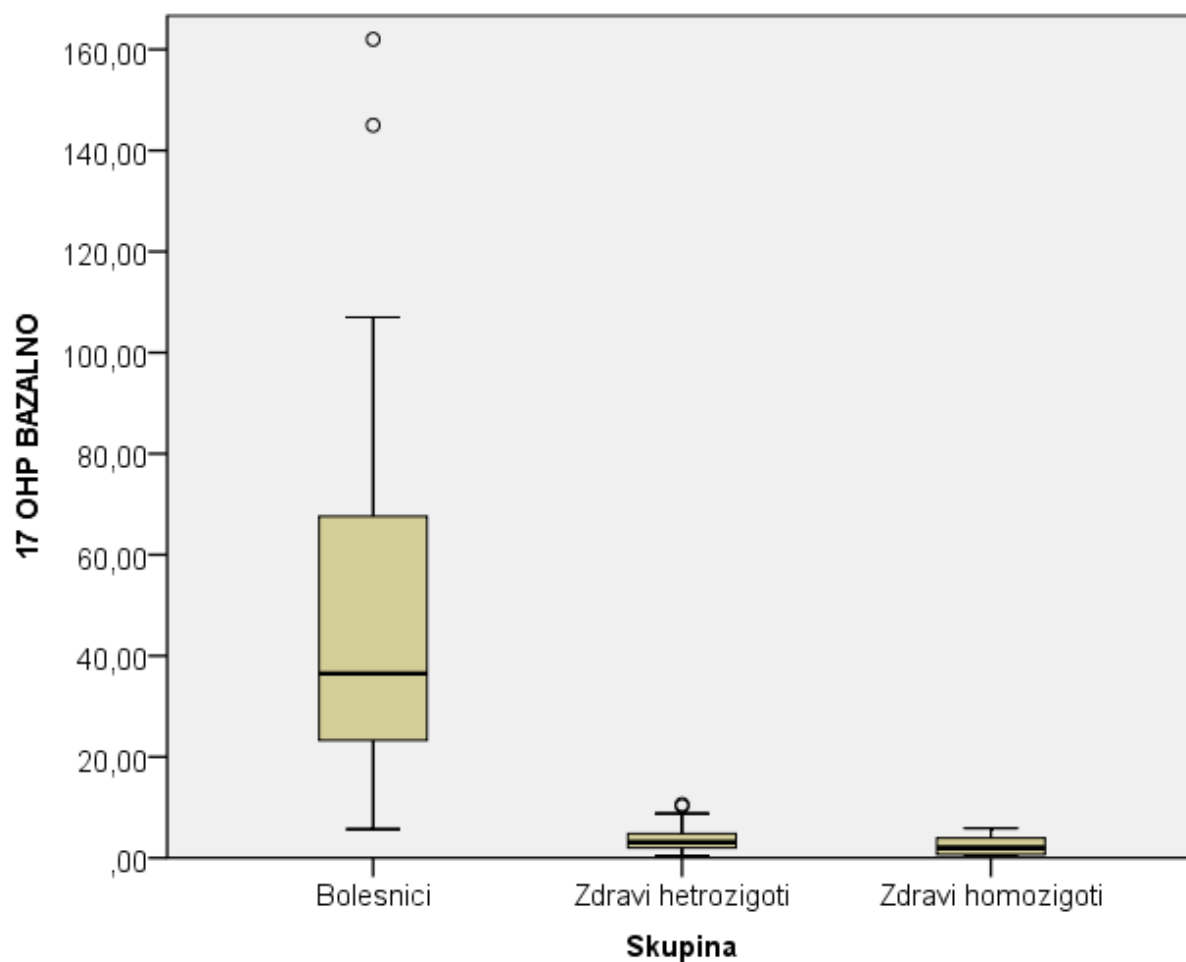


Tablica 4.4.2. Razlike koncentracija 17-hidroksiprogesterona bazalno i nakon stimulacije s adrenokortikotropnim hormonom (60-minutni test stimulacije s ACTH) u bolesnika s neklasičnim oblikom kongenitalne adrenalne hiperplazije (u kojih su nađene obje mutacije gena *CYP21A2*), heterozigota i homozigota (potvrđenih genotipizacijom) (post-hoc testiranje Mann-Whitney U testom)

	<b>Bolesnici vs zdravi homozigoti</b>		<b>Zdravi homozigoti vs heterozigoti</b>		<b>Bolesnici vs heterozigoti</b>	
	17 OHP BAZALNO	17 OHP STIMULIRANI	17 OHP BAZALNO	17 OHP STIMULIRANI	17 OHP BAZALNO	17 OHP STIMULIRANI
Mann-Whitney U	1,000	0,000	60,000	55,000	15,000	1,000
Z	-3,881	-3,864	-,980	-1,214	-6,711	-6,654
P	<0,001	<0,001	0,327	0,225	<0,001	<0,001

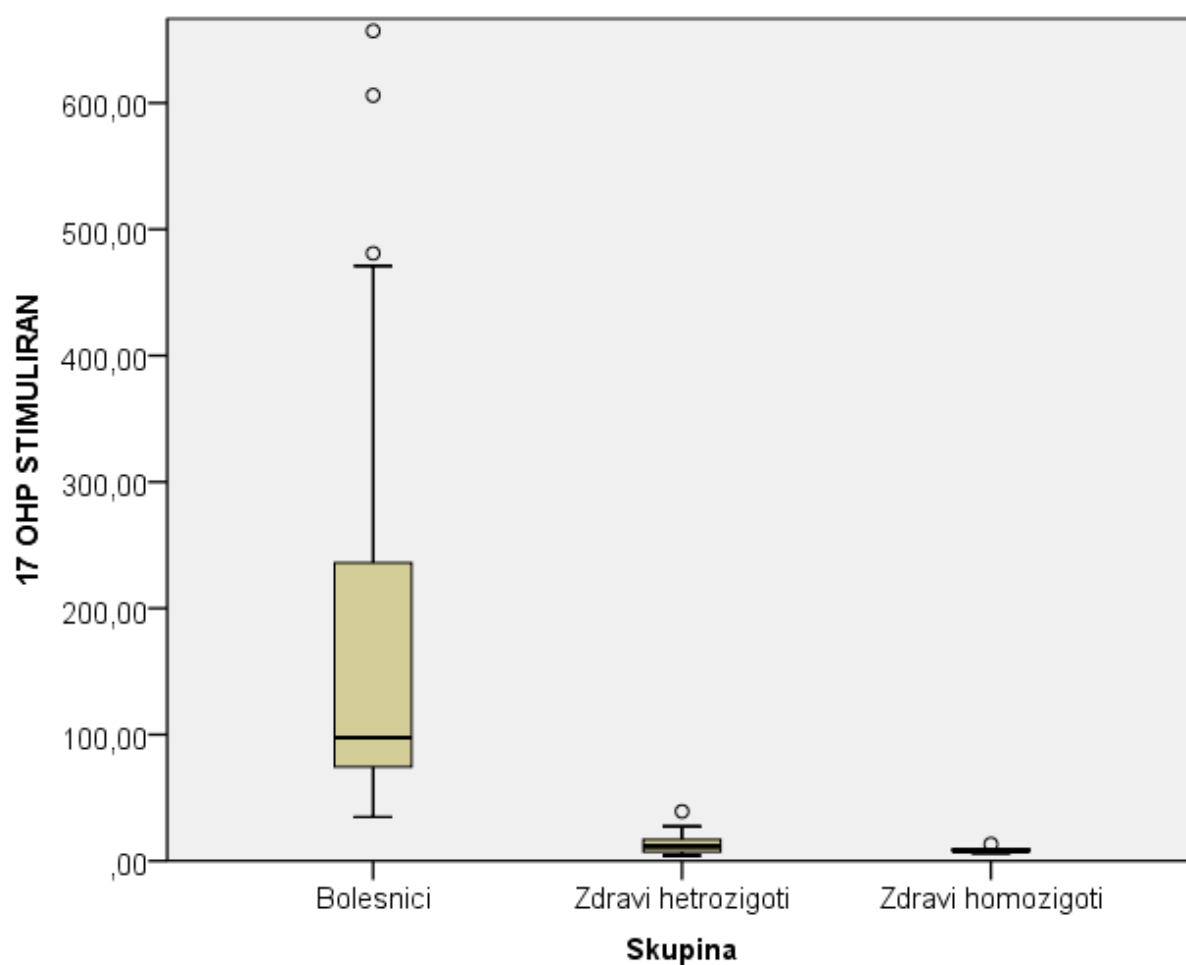
vs – u odnosu na; 17-OHP – 17-hidroksiprogesteron

Statistički značajna razlika u koncentracijama 17-OHP bazalno i nakon stimulacije s ACTH utvrđena je između bolesnika s NKKAH-om u odnosu na skupine zdravih homozigota i heterozigota. Nije bilo statistički značajne razlike u koncentracijama 17-OHP bazalno i nakon stimulacije s ACTH između zdravih homozigota i heterozigota (Slika 4.7. i 4.8.).



Slika 4.7. Razlike bazalnih koncentracija 17-hidroksiprogesterona između bolesnika s neklasičnim oblikom kongenitalne adrenalne hiperplazije (u kojih su nađene obje mutacije gena *CYP21A2*), heterozigota i homozigota (potvrđenih genotipizacijom) - Box i Whiskerov plot.

17-OHP – 17-hidroksiprogesteron



Slika 4.8. Razlike koncentracija 17- hidroksiprogesterona nakon stimulacije s adrenokortikotropnim hormonom (60-minutni test stimulacije s ACTH) između bolesnika s neklasičnim oblikom kongenitalne adrenalne hiperplazije (u kojih su nađene obje mutacije gena *CYP21A2*), heterozigota i homozigota (potvrđenih genotipizacijom) - Box i Whiskerov plot.

17-OHP – 17-hidroksiprogesteron

#### **4.4.2. Analiza osjetljivosti i specifičnosti izmjerenih koncentracija 17-OHP bazalno i nakon stimulacije s ACTH kod bolesnika s NKKAH-om i zdravih ispitanika – ROC analiza (engl. «Receiver Operating Characteristic Curve»)**

U skupini bolesnika s NKKAH-om u kojih su dokazane obje mutacije gena *CYP21A2* ispitili smo optimalne granične vrijednosti (engl. «cut-off koncentracija 17-OHP bazalno i nakon stimulacije s ACTH za potvrdu dijagnoze NKKAH-e).

Bazalna koncentracija 17-OHP s najboljom osjetljivošću i specifičnošću u našoj skupini ispitanika je 8,8 nmol/l (osjetljivost 95,10%, specifičnost 92,59%) (Tablica 4.4.3.). Koncentracija 17-OHP nakon stimulacije s ACTH s najboljom osjetljivošću i specifičnošću u našoj skupini ispitanika je 39,2 nmol/l (osjetljivost 97,06%, specifičnost 100%) (Tablica 4.4.4.).

Područja ispod ROC krivulja (engl. «Receiver Operating Characteristic Curve») su 0,988% (95% interval pouzdanosti (engl. «confidence interval»), CI 0.921-1.000) za bazalne koncentracije 17-OHP (Slika 4.9.) i 0,999% (95% interval pouzdanosti, CI 0.939-1.000) za koncentracije 17-OHP nakon stimulacije (Slika 4.10.).

Koristeći kriterij za graničnu koncentraciju bazalnog 17-OHP veću od 8,8 nmol/l, dva bolesnika s NKKAH-om bi ostala neprepoznata (lažno negativni), dok bi tri heterozigota bila procijenjena kao oboljeli od NKKAH-e (lažno pozitivni).

Koristeći kriterij od 39,2 nmol/l za graničnu koncentraciju 17-OHP nakon stimulacije, niti jedan bolesnik s NKKAH-om ne bi ostao neprepoznat, a jedan heterozigot bio bi procijenjen kao oboljeli od NKKAH-e (lažno pozitivni).

Tablica 4.4.3. Analiza osjetljivosti i specifičnosti (ROC analiza, engl. «*Receiver Operating Characteristic Curve*») bazalnih koncentracija 17-hidroksiprogesterona u bolesnika s neklasičnim oblikom kongenitalne adrenalne hiperplazije u odnosu na zdrave ispitanike.

Područje ispod ROC krivulje (AUC)	0,988
Standardna greška <sup>a</sup>	0,00931
95% interval pouzdanosti <sup>b</sup>	0,921 do 1,000
z vrijednost	52,186
Razina značajnosti p	<0,0001

Kriterij	Osjetljivost	95% CI	Specifičnost	95% CI
≥0,4	100,00	91,2 – 100,0	0,00	0,0 – 12,8
>5,1	100,00	91,2 – 100,0	81,48	61,9 – 93,7
>5,7	97,50	86,8 – 99,9	81,48	61,95 – 93,7
>7	97,50	86,8 – 99,9	85,19	66,3 – 95,8
>7,9	95,10	83,1 – 99,4	85,19	66,3 – 95,8
>8,8 *	95,10	83,1 – 99,4	92,59	75,7 – 99,1
>9,6	87,50	73,2 – 95,8	92,59	75,7 – 99,1
>10,6	87,50	73,2 – 95,8	100,00	87,2 – 100,0
>271	0,00	0,0 – 8,8	100,00	87,2 – 100,0

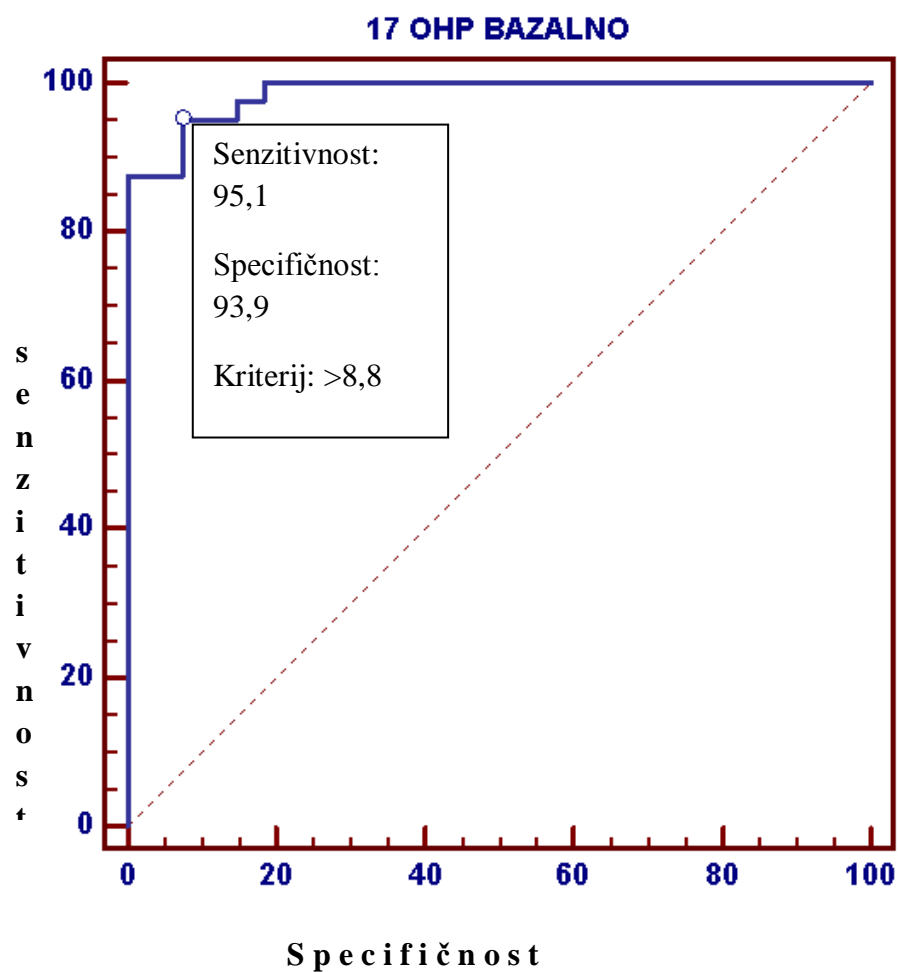
CI - interval pouzdanosti (engl. «*confidence interval*»)

Tablica 4.4.4. Analiza osjetljivosti i specifičnosti (ROC analiza, engl. «*Receiver Operating Characteristic Curve*») koncentracija 17-hidroksiprogesterona nakon stimulacije s adrenokortikotropnim hormonom (60-minutni test stimulacije s ACTH) u bolesnika s neklasičnim oblikom kongenitalne adrenalne hiperplazije u odnosu na zdrave ispitanike

Područje ispod ROC krivulje (AUC)	0,999
Standardna greška <sup>a</sup>	0,00154
95% interval pouzdanosti <sup>b</sup>	0,939 do 1,000
z vrijednost	323,855
Razina značajnosti p	<0,001

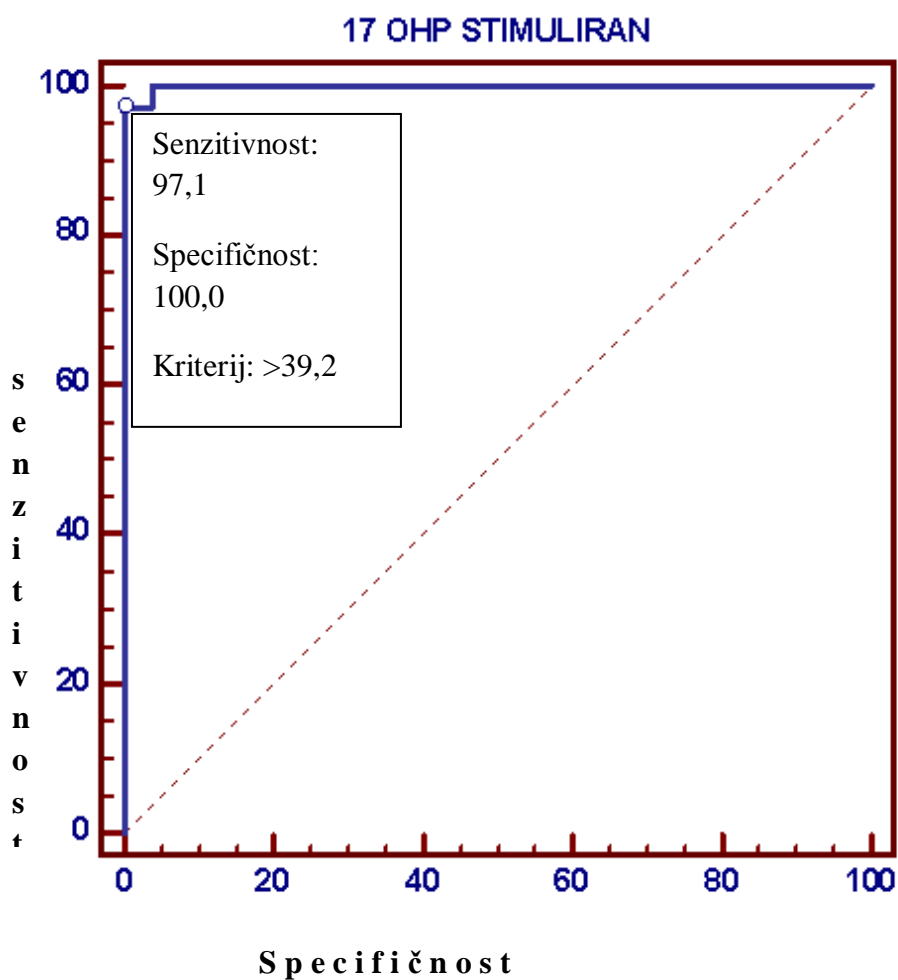
Kriterij	Osjetljivost	95% CI	Specifičnost	95% CI
≥4,21	100,00	89,7 – 100,0	0,00	0,0 – 12,8
>27,5	100,00	89,7 – 100,0	96,30	81,0 – 99,9
>34,9	97,06	84,7 – 99,9	96,30	81,0 – 99,9
>39,2 *	97,06	84,71 – 99,9	100,00	87,24 – 100,0
>657	0,00	0,0 – 10,3	100,00	87,2 – 100,0

CI - interval pouzdanosti (engl. «*confidence interval*»)



Slika 4.9. Analiza osjetljivosti i specifičnosti bazalnih koncentracija 17-hidroksiprogesterona u bolesnika s nekласičnim oblikom kongenitalne adrenalne hiperplazije u odnosu na zdrave ispitanike - ROC krivulja (engl. «*Receiver Operating Characteristic Curve*»).

17-OHP – 17-hidroksiprogesteron



Slika 4.10. Analiza osjetljivosti i specifičnosti koncentracija 17-hidroksiprogesterona nakon stimulacije s adrenokortikotropnim hormonom (60-minutni test stimulacije s ACTH) u bolesnika s neklasičnim oblikom kongenitalne adrenalne hiperplazije u odnosu na zdrave ispitanike - ROC krivulja (engl. «*Receiver Operating Characteristic Curve*»)

17-OHP – 17-hidroksiprogesteron



## 5. RASPRAVA

Neklasični oblik kongenitalne adrenalne hiperplazije najblaži je oblik ove autosomno-recesivne bolesti koju karakterizira velika varijabilnost kliničke slike, od potpuno asimptomatskih bolesnika do onih koji se prezentiraju slikom hipersekrecije androgena u ranoj dječjoj dobi. Unatoč visokoj učestalosti, osobito u nekim populacijama, bolest još uvijek često ostaje nedijagnosticirana, posebno u muškaraca.

Ovim istraživanjem obuhvatili smo 49 bolesnika (38 nesrodnih) s NKKAH-om u Hrvatskoj i 64 člana njihovih obitelji koji su liječeni u Zavodu za endokrinologiju i dijabetes Klinike za pedijatriju u razdoblju od 1982. do 2012. godine.

U najvećem broju do sada provedenih istraživanja radilo se uglavnom o manjim skupinama ispitanika, pri čemu je u većine bolesnika bolest prepoznata tek u o odrasloj dobi. U Tablici 5.1. naveden je broj i raspodjela ispitanika prema dobi i spolu za neke od studija s većim brojem ispitanika u svijetu.

Našu ispitivanu skupinu karakterizira relativno veliki broj ispitanika u odnosu na veličinu ispitivane populacije (4.290.612 stanovnika u Hrvatskoj prema popisu stanovništva iz 2011. godine), velik broj bolesnika dječje dobi (mlađi od 18 godina), te velik broj muških bolesnika. Radi se o najvećoj skupini bolesnika s NKKAH-om u području srednje i istočne Europe.

Tablica 5.1. Ukupni broj nesrodnih ispitanika s nekласičnim oblikom kongenitalne adrenalne hiperplazije i raspodjela prema dobi i spolu u različitim populacijama u svijetu

	Hrvatska <sup>1</sup>	Brazil (77)	SAD (9)	multi centrična studija <sup>2</sup> (19)	Francuska 2001. (85)	Španjolska 2002. (145)	Sredn ja Europa <sup>3</sup> (103)	SAD 2006. (17)	Francuska 2010. (36)	Italija 2011. (146)	Italija 2011. (74)	SAD 2012. (147)	Brazil 2013. (148)
<b>N</b>	<b>38</b>	58	34	220	56	86	35	440	190	66	55	61	114
<b>D</b>	<b>25</b>	28	-	79	-	86	35	NP	-	31	55	31	53
<b>M</b>	<b>11</b>	5	-	-	-	NP	12	96	-	11	NP	11	10
<b>%</b>	<b>28,95%</b>	8,6%					34,3%	21,8%		16,7%		18,0%	8,8%

N – ukupan broj nesrodnih ispitanika; D – broj ispitanika mlađih od 18 godina; M – broj muških ispitanika, % - udio muških bolesnika, <sup>1</sup>u analizu su uključeni nesrodni bolesnici s nekласičnim oblikom kongenitalne adrenalne hiperplazije; <sup>2</sup> –multicentrična studija koja je obuhvaćala ispitanike iz SAD, Francuske, Italije, Meksika, Španjolske, Brazila i Portugala; broj bolesnika odnosi se na mlađe od 19 godina; <sup>3</sup> – ispitivanje populacije Srednje Europe obuhvatilo je stanovništvo Austrije, Češke, Slovačke, Mađarske i Slovenije, NP – nije poznato

### 5.1. Kliničke osobine bolesnika s NKAH-om i heterozigota

Neovisno o tome jesu li otkriveni zbog simptoma hipersekrecije androgena (55,1% ispitanika) ili analizom članova obitelji (44,9% ispitanika), prilikom postavljanja dijagnoze 73,47% naših ispitanika s NKAH-om imalo je neki od simptoma hipersekrecije androgena. Podaci u literaturi razlikuju se u ovisnosti o načinu odabira ispitivane skupine. U studijama u kojima je kriterij uključivanja bila prisutnost nekog od simptoma hiperandrogenizma, svi ispitanici su bili simptomatski (35, 74, 85, 146), no u studijama u kojima su praćeni bolesnici s NKAH-om neovisno o načinu otkrivanja bolesti, udio simptomatskih bolesnika je oko 90% (89,7% (77), 90,4% (148)).

U našoj skupini ispitanika s NKAH-om, statistički je značajno više bolesnica s NKAH-om imalo simptome hiperandrogenizma u odnosu na muške ispitanike. Većina

muških bolesnika je otkrivena analizom članova obitelji i nema nikakvih simptoma, no neki od njih su otkriveni u ranoj dječjoj dobi, te nije moguće isključiti kasniji razvoj simptoma. Među ženskim bolesnicama s NKKAH-om, samo dvije bolesnice koje su otkrivene analizom članova obitelji u ranoj dječjoj dobi, prilikom postavljanja dijagnoze nisu imale niti jedan od kliničkih znakova hiperandrogenizma. Dugotrajno praćenje ispitanika s NKKAH-om pokazalo je kako ipak najveći broj bolesnika u nekom životnom razdoblju razvije jedan ili više simptoma hipersekrecije androgena (17), iako dio bolesnika može ostati asimptomatski, unatoč povišenim razinama androgena (40, 41).

Izostanak jasnih kliničkih simptoma u dijela muških bolesnika s NKKAH-om razlog je njihove slabije zastupljenosti u većini do sada provedenih istraživanja u različitim populacijama u svijetu (Tablica 5.1.). Obzirom da se radi o autosomno-recesivnoj bolesti, učestalost bi trebala biti ista u muških i ženskih ispitanika. U našem uzorku bolesnika s NKKAH-om, udio muških ispitanika je 36,7%, odnosno omjer muških i ženskih bolesnika je 1:1,7, što jasno ukazuje kako značajan dio muških osoba s NKKAH-om ostaje neprepoznat.

Prosječna dob prilikom postavljanja dijagnoze u skupini ispitanika otkrivenih zbog simptoma hiperandrogenizma je  $10.0 \pm 6.59$  godina, što odražava dobnu distribuciju bolesnika koji se prate u Zavodu za endokrinologiju i dijabetes Klinike za pedijatriju.

Najčešći simptomi prije početka puberteta u našoj skupini ispitanika su razvoj preuranjene pubične dlakavosti i ubrzana koštana zrelost. Dob pojave simptoma u našoj skupini ispitanika statistički je značajno ranija u djevojčica s NKKAH-om u odnosu na dječake. Rezultati naše studije u skladu su s rezultatima dosadašnjih istraživanja, u kojima je vodeći simptom u djece s NKKAH-om također preuranjeni razvoj pubične dlakavosti (19, 74, 77, 146). I u našoj ispitivanoj skupini ubrzano koštano dozrijevanje bilo je jače izraženo nego ubrzanje rasta, što su opisali i Pijnenburg-Kleizen i suradnici (20). U usporedbi sa studijom koju su proveli Einaudi i sur. (146), u kojoj su dječaci s NKKAH-om prilikom postavljanja dijagnoze imali značajno uznapređovaliju koštanu dob nego djevojčice, u našoj ispitivanoj skupini prilikom postavljanja dijagnoze nije bilo razlike u odstupanju koštane dobi između djevojčica i dječaka s NKKAH-om. Prilikom postavljanja dijagnoze međutim, dječaci s NKKAH-om su bili statistički značajno viši u odnosu na prosječnu visinu za dob u usporedbi s djevojčicama s NKKAH-om ( $p=0,023$ ).

Među bolesnicama s NKKAH-om menarha je nastupila ranije nego u općoj populaciji u Hrvatskoj (144). Kako su povišene razine adrenalnih androgena u predpubertetskom

razdoblju povezane s ranijom dobi menarhe (149), pretpostavljamo kako je i u naših bolesnica hipersekrecija androgena dovela do ranijeg početka puberteta.

Iako bolesnice s NKKAH-om u pravilu nemaju virilizirano vanjsko spolovilo, u manjeg broja bolesnica opisuje se blaga klitoromegalija (9, 35, 77, 80, 148, 150, 151). Rezultati ovog rada pokazali su da je pet bolesnica s NKKAH-om imalo blagu klitoromegaliju. U tri bolesnice klitoromegalija je uočena po porodu i bila je jedini simptom. U jedne bolesnice, koja je otkrivena analizom članova obitelji, klitoromegalija je uočena tek u odrasloj dobi, a u jedne je bolesnice otkrivena prilikom postavljanja dijagnoze, ali nije bila vodeći simptom.

Klitoromegalija je češće udružena s mutacijom u ezgonu 1 (P30L) (77, 80) ili se nađe u bolesnica koje su nosioci jedne «teške» mutacije (148). Teža klinička slika u nekih bolesnika s mutacijom P30L objašnjava se prisutnošću dodatnih mutacija promotorske regije pseudogena (117, 118, 119). Zanimljivo je da među 10 bolesnica s klitoromegalijom koje su opisali Moura-Massari i sur., niti jedna bolesnica nije bila nosioc mutacije P30L (148), no ova mutacija je i inače rijetka u bolesnika s NKKAH-om u Brazilu. Među bolesnicama s NKKAH-om u Brazilu koje su se prezentirale klitoromegalijom (148) 3/10 bolesnica nose dvije «blage» mutacije, 6/10 bolesnica nose jednu «umjereno tešku/tešku» mutaciju u kombinaciji s «blagom» mutacijom, a jedna bolesnica je bila nosioc kombinacije «teške» i «umjereno teške» mutacije, iako su njezina klinička slika i koncentracije hormona odgovarale neklasičnom obliku bolesti.

Među našim ispitanicama samo je jedna bolesnica s klitoromegalijom nosioc mutacije u ezgonu 1 (P30L) u kombinaciji s «umjereno teškom» mutacijom. Jedna bolesnica, u koje je klitoromegalija bila uočena po porodu je homozigot za mutaciju u ezgonu 7 (V281L), a preostale tri bolesnice su «složeni heterozigoti» i nose «blagu» mutaciju u ezgonu 7 (V281L) u kombinaciji s «umjereno teškom/teškom» mutacijom na drugom alelu. Teža klinička slika u nekih bolesnika s «blagom» mutacijom u ezgonu 7 (V281L) može se objasniti različitom perifernom osjetljivošću na djelovanje androgena i različitim brojem adrogenih receptora, postojanjem dodatnih, za sada nepoznatih mutacija udruženih s mutacijom u ezgonu 7 ili utjecajem modifikacijskih gena koji sudjeluju u metabolizmu androgena (16, 43, 85, 89, 120, 121, 148). U bolesnice s klitoromegalijom koja je nosioc mutacije u ezgonu 1 (P30L) bilo bi zanimljivo učiniti dodatno testiranje promotorske regije gena *CYP21A2*, obzirom da se teža

klinička slika u nekih bolesnika koji su nosioci mutacije u egzonu 1 objašnjava dodatnim mutacijama u promotorskoj regiji gena *CYP21A2* (117, 118, 119).

Poznato je kako dio bolesnika s NKKAH-om unatoč visokoj razini androgena nema nikakvih kliničkih simptoma (39, 40, 41). U našoj skupini, 13 ispitanika otkrivenih analizom članova obitelji nije imalo nikakvih simptoma; među njima svih šest odraslih asimptomatskih ispitanika su muškog spola. Dio bolesnika tijekom praćenja razvije simptome (17, 41); češće se radi o ispitanicama u kojih se u odrasloj dobi opisuju poremećaji menstruacijskog ciklusa i neplodnost. S druge strane, muški ispitanici otkriveni u odrasloj dobi najčešće su asimptomatski i ne zahtijevaju uvođenje terapije. U našoj skupini ispitanika, niti u jednog odraslog bolesnika nije bilo potrebe za uvođenjem glukokortikoidne terapije.

Dvanaest ispitanika s NKKAH-om otkriveni su analizom članova iz devet obitelji u kojima je rođeno dijete s klasičnim oblikom KAH-e. U jednoj obitelji su kroz tri generacije otkrivena čak četiri bolesnika s NKKAH-om (116). Objе ženske ispitanice odrasle dobi imale su simptome hiperandrogenizma, jedan muški ispitanik odrasle dobi imao je preuranjeni razvoj pubične dlakavosti i hirsutizam, a četvrti član s NKKAH-om, otkriven u ranoj dječjoj dobi, za sada nema nikakvih simptoma. I u drugim obiteljima nađena je velika varijabilnost kliničke slike unutar iste obitelji, pa su istovremeno nađeni simptomatski i asimptomatski bolesnici. Razlike u kliničkoj slici u bolesnika unutar iste obitelji objašnjavaju se razlikama u ekspresiji bolesti ovisno o dobi bolesnika, različitom metabolizmu steroida i individualnoj osjetljivosti na androgene, razlikama u potrebi za kortizolom i stvaranju androgena, različitim metaboličkim putovima koji daju prednost sintezi ili razgradnji androgena, alternativnim metaboličkim putevima sinteze androgena, razlikama u metaboličkom klirensu pa čak i postojanjem kompenzatornih gena ili regulatornih gena koji mijenjaju aktivnost enzima 21-hidroksilaze (8, 35, 120, 148).

Heterozigotni nosioci mutacija gena *CYP21A2* češće se nađu među bolesnicima s teškim oblicima akni (neovisno o vrsti mutacije; 55, 57), prematurnim pubarhama (72, 74, 131), hirsutizmom (132, 133, 134, 135) i sindromom policističnih jajnika (136). Među članovima obitelji naših bolesnika s NKKAH-om, tri ispitanika koji su dokazani heterozigotni nosioci mutacije gena *CYP21A2* imala su simptome hipersekrecije androgena (hirsutizam, subfertilitet i akne), u dvije ispitanice koje imaju simptome hiperandrogenizma nije učinjena genotipizacija, a jedna ispitanica s izraženim hirsutizmom je zdravi homozigot. Kako se, međutim, u većine ispitanika radilo o retrogradom prikupljanju anamnestičkih

podataka moguće je da su se neki od simptoma hipersekrecije androgena previdjeli. Obzirom na mali broj simptomatskih bolesnika, u našoj skupini ispitanika nije moguće pouzdano procijeniti učestalost simptoma hiperandrogenizma u heterozigota, kao ni povezanost s genotipom. S druge strane, u studiji provedenoj u Italiji kod 234 člana obitelji bolesnika s različitim oblicima KAH-e (161 heterozigot, 73 zdrava homozigota) nije nađena razlika u kliničkoj slici između heterozigota i zdravih homozigota, odnosno nije nađen niti jedan klinički kriterij po kojem bi se mogli razlikovati nosioci mutacije gena *CYP21A2* (152). Bilo bi zanimljivo dobiti slične podatke za druge populacije i veći broj ispitanika, kako bi se ispitala povezanost simptoma hiperandrogenizma s prisutnošću jedne mutacije gena *CYP21A2*.

## **5.2. Biokemijske osobine bolesnika s NKKAH-om i heterozigota**

Probir potencijalnih bolesnika s NKKAH-om nerijetko se temelji na povišenoj bazalnoj koncentraciji 17-OHP, pri čemu se kao granična vrijednost najčešće uzima koncentracija viša od 6 nmol/l u folikularnoj fazi ciklusa (73, 76). Kao najniža granična vrijednost koncentracije 17-OHP nakon stimulacije s ACTH uzima se 30 nmol/l (75), iako dio istraživača smatra kako bi granična vrijednost trebala biti viša: 42 nmol/l (74), 45 nmol/l (78), između 54 i 60 nmol/l (77, 79) ili čak 90 nmol/l (80).

Kako bi preispitali postojeće biokemijske kriterije za postavljanje dijagnoze NKKAH-e, analizirali smo koncentracije 17-OHP izmjerene bazalno i nakon stimulacije s ACTH u bolesnika s NKKAH-om u kojih su nađene obje mutacije gena *CYP21A2*. Bazalne koncentracije 17-OHP bile su više od 15 nmol/l u 31/40 bolesnika (77,5%), između 6 i 15 nmol/l u 8/40 bolesnika (20,0%), a manje od 6 nmol/l u samo jedne bolesnice (2,5%). Rezultati našeg istraživanja podudaraju se s istraživanjem koje su proveli Escobar-Morreale i sur. 2008, prema kojem bazalna koncentracija 17-OHP od 5,15 nmol/l ima 100% osjetljivost i specifičnost 88,6% (153), dok je u našem uzorku ispitanika za istu bazalnu koncentraciju 17-OHP osjetljivost 100%, a specifičnost 81,48%. U brojnim drugim do sada provedenim studijama opisani su bolesnici s NKKAH-om u kojih je bazalna koncentracija 17-OHP bila manja od 6 nmol/l (9, 19, 35, 42, 74, 77). Ispitivanjem velike skupine djece s prematurnim pubarhama, od kojih je 55 imalo NKKAH, Ghizzoni i sur. (74) zaključili su da bazalne koncentracije 17-OHP nisu korisne u diskriminaciji bolesnika s NKKAH-om u populaciji

bolesnika s prematurnim pubarhama (74). Zanimljivo je da je u našoj skupini ispitanika, neovisno o prisutnosti simptoma hiperandrogenizma i načinu otkrivanja bolesnika, samo jedna ispitanica imala nisku bazalnu koncentraciju 17-OHP, a većina bolesnika, i simptomatskih i asimptomatskih, imala je bazalne koncentracije 17-OHP više od 15 nmol/l.

U 33 bolesnika u kojih su nađene obje mutacije gena *CYP21A2* određene su koncentracije 17-OHP nakon stimulacije s ACTH. Koncentracije 17-OHP nakon stimulacije bile su više od 90 nmol/l u 18 bolesnika (54,5%), između 60 i 90 nmol/l u 11 bolesnika (33,3%), između 45 i 60 nmol/l u tri bolesnika (9,1%), a samo je jedan ispitanik imao koncentraciju 17-OHP u rasponu od 30 do 45 nmol/l (3,1%). Najniža izmjerena koncentracija 17-OHP nakon stimulacije s ACTH u našoj skupini ispitanika bila je 44,35 nmol/l.

U svih šest bolesnika u kojih je nađena samo jedna mutacija gena *CYP21A2* koncentracije 17-OHP nakon stimulacije s ACTH bile su veće od 59 nmol/l, što odgovara porastu koncentracija 17-OHP kod bolesnika s NKKAH, čak i prema strožim kriterijima.

Jedina bolesnica u koje nije nađena niti jedna mutacija gena *CYP21A2* (#8) imala je visoke koncentracije 17-OHP bazalno (59,68 nmol/l) i nakon stimulacije s ACTH (71,23 nmol/l).

Ovi bolesnici najvjerojatnije su nosioci delecija ili neke od rijetkih mutacija gena *CYP21A2*, koje nisu bile testirane u našem istraživanju. U skupini od 175 ispitanika s NKKAH-om u Brazilu (148), u kojih je na osnovu biokemijskih kriterija postavljena dijagnoza NKKAH-e, dvije mutacije gena *CYP21A2* potvrđene su u 65,14% ispitanika (114/175) (148). Sekvencioniranjem gena *CYP21A2* u 124 simptomatske bolesnice s NKKAH-om u Francuskoj (35), u jedne bolesnice nije nađena druga mutacije gena *CYP21A2*. Relativno velika učestalost alela s neidentificiranim mutacijama u bolesnika s NKKAH-om (77, 80) potaknula je raspravu o potrebi preispitivanja postojećih biokemijskih kriterija, no sekvencioniranjem gena *CYP21A2* u bolesnika u kojih je na osnovu biokemijskih kriterija postavljena dijagnoza NKKAH-e učestalost neidentificiranih alela je značajno manja (35). U našoj skupini bolesnika s NKKAH-om u kojih nisu definirane obje mutacije gena *CYP21A2*, šest od sedam ispitanika imalo je simptome hiperandrogenizma, a 2/7 bolesnika su srodni (bolesnici #38 i #39, te #46 i #47 su braća).

Između skupina simptomatskih i asimptomatskih bolesnika nije nađena statistički značajna razlika u koncentracijama 17-OHP bazalno ( $p=0,768$ ) i nakon stimulacije s ACTH ( $p=0,531$ ).

Analizirana su i 64 dostupna člana obitelji bolesnika s NKKAH-om, koji ne boluju niti od jednog od oblika KAH-e. Bazalne koncentracije 17-OHP u pet heterozigota (11,4%) bile su više od 6 nmol/l, a u jednog zdravog homozigota bazalna koncentracija 17-OHP bila je 5,9 nmol/l. Najviša bazalna koncentracija 17-OHP izmjerena u heterozigota u našoj skupini ispitanika je 10,6 nmol/l.

Raspon koncentracija 17-OHP nakon stimulacije s ACTH pokazuje značajno preklapanje između zdravih homozigota (koncentracije 17-OHP između 5,98 i 13,30 nmol/l) i heterozigota (koncentracije 17-OHP između 4,21 i 39,90 nmol/l). Koncentracije 17-OHP nakon stimulacije s ACTH u svih heterozigota u našem uzorku ispitanika bile su manje od 30 nmol/l, osim u jedne ispitanice (39,20 nmol/l). Prema postojećim biokemijskim kriterijima (75) gornja granica koncentracija 17-OHP kod heterozigota je 30 nmol/l. No u istraživanjima koje su proveli Bidet i sur. (35) i Bachega i sur. (79) neki od heterozigota imali su koncentracije 17-OHP nakon stimulacije s ACTH i veće od 30 nmol/l. Istraživanjem koje su proveli Napolitano i sur. (152) na 222 roditelja bolesnika s klasičnim i neklasičnim oblikom KAH-e, koji su obligatni heterozigoti, te 30 zdravih homozigota, utvrđeno je kako nema razlike u bazalnim koncentracijama 17-OHP između zdravih homozigota i heterozigota, ali koncentracija 17-OHP nakon stimulacije od 9 nmol/l ima 90% osjetljivost i 74,3% specifičnost za razlikovanje homozigota i heterozigota. Napolitano i sur. smatraju kako se na osnovu koncentracija 17-OHP nakon stimulacije može donijeti odluka o provođenju analize mutacija gena *CYP21A2* (152). Prema rezultatima našeg istraživanja, međutim, ukoliko bi se kao granična koncentracija 17-OHP nakon stimulacije s ACTH za razlikovanje homozigota i heterozigota koristila vrijednost od 9 nmol/l, 7/22 heterozigota (31,8%) bilo bi neprepoznato.

Bazalna koncentracija 17-OHP s najboljom osjetljivošću i specifičnošću u našoj skupini bolesnika s NKKAH-om je 8,8 nmol/l (osjetljivost 95,1%, specifičnost 92,5%). Koristeći kriterij za graničnu koncentraciju bazalnog 17-OHP veću od 8,8 nmol/l, dva bolesnika s NKKAH-om u našoj skupini ispitanika bi ostala neprepoznata (lažno negativni), dok bi tri heterozigota bila procijenjena kao oboljeli od NKKAH-e (lažno pozitivni).



Rezultati našeg istraživanja upućuju kako je u svih ispitanika s bazalnom koncentracijom 17-OHP višom od 8,8 nmol/l nužno učiniti daljnju dijagnostičku obradu zbog sumnje na neklasični oblike KAH-e.

Prema rezultatima našeg istraživanja, bazalna koncentracija 17-OHP viša od 10,6 nmol/l upućuje na postojanje neklasičnog oblika KAH-e (osjetljivost 87,5%, specifičnost 100%).

U ispitanika s bazalnom koncentracijom 17-OHP višom od 5,1 nmol/l (osjetljivost 100%, specifičnost 81,48%) i kliničkom sumnjom na NKKAH-u preporuča se učiniti test stimulacije s ACTH, ali vodeći računa kako u rasponu bazalnih koncentracija od 5,1 do 10,6 nmol/l postoji preklapanje između heterozigota, bolesnika s NKKAH-om, pa čak i zdravih homozigota.

Koncentracija 17-OHP nakon stimulacije s ACTH s najboljom osjetljivošću i specifičnošću u našoj skupini ispitanika s NKKAH-om je 39,2 nmol/l (osjetljivost 97,06%, specifičnost 100%). Koristeći kriterij od 39,2 nmol/l za graničnu koncentraciju 17-OHP nakon stimulacije, niti jedan bolesnik s NKKAH-om ne bi ostao neprepoznat, a jedan heterozigot bio bi procijenjen kao oboljeli od NKKAH-e (lažno pozitivni).

Rezultati ovog rada upućuju kako je u svih ispitanika s koncentracijom 17-OHP nakon stimulacije s ACTH višom od 39,2 nmol/l nužno učiniti analizu mutacija gena *CYP21A2* radi potvrde dijagnoze NKKAH-e.

Između bolesnika s NKKAH-om u odnosu na skupine zdravih homozigota i heterozigota potvrđene su statistički značajne razlike u koncentracijama 17-OHP bazalno i nakon stimulacije s ACTH. Nije nađena statistički značajna razlika u koncentracijama 17-OHP bazalno i nakon stimulacije s ACTH između zdravih homozigota i heterozigota ( $p=0,327$  za bazalne koncentracije 17-OHP i  $p=0,225$  za koncentracije 17-OHP nakon stimulacije).

Zbog velike varijabilnosti koncentracija 17-OHP bazalno i nakon stimulacije, test stimulacije s ACTH u našoj populaciji nije dovoljno pouzdana dijagnostička metoda za razlikovanje zdravih homozigota i heterozigota, što je u skladu s ranije provedenim istraživanjima u Brazilu (77) i Francuskoj (35).

### **5.3. Rezultati analize gena HLA i mutacija gena *CYP21A2* u bolesnika s NKKAH-om i heterozigota**

U svih bolesnika koji nose ili samo HLA-B14 ili kombinaciju HLA-B14,-DR1 nađena je mutacija u egzonu 7 (V281L). To je u suprotnosti s ranije provedenim istraživanjima bolesnika s NKKAH-om u Hrvatskoj (15, 125, 126) u kojima nije nađena povezanost s navedenim antigenima. Ova su istraživanja, međutim, bila provedena na manjem broju ispitanika koju su bili otkriveni analizom članova obitelji u kojima se rodilo dijete s klasičnim oblikom KAH-e. U kasnijem istraživanju koje su proveli Dumić i sur. (34) na 18 bolesnika s NKKAH-om nađena je povećana učestalost mutacije V281L, ali u samo 53,8% ispitanika ona je bila povezana s HLA-B14,-DR1. U našoj skupini ispitanika s NKKAH-om koji su nosioci mutacije u egzonu 7 (V281L), 74,47% alela koji nose mutaciju u egzonu 7 povezano je s HLA-B14.

Našim istraživanjem koje je provedeno na većem broju ispitanika, kojim su obuhvaćeni i simpatomatski i asimptomatski bolesnici, potvrđeno je kako mutacija u egzonu 7 (V281L) i u našoj populaciji povezana s HLA-B14, iako u nešto manjoj mjeri nego u ranije provedenim studijama u drugim populacijama (5, 85, 154). Kombinacija HLA-A33,-B14 nađena je u 56,82% testiranih ispitanika koji su svi imali mutaciju u egzonu 7, što je veće nego u istraživanju koje su proveli Deneux i sur. i Bidet i sur. među bolesnicima s NKKAH-om u Francuskoj (33.3% (85); 41,2% (35)).

Niti jedan bolesnik nije imao haplotip HLA-A33,-B47,-DR7 koji se povezuje s klasičnim oblikom KAH-e zbog delecije gena za 21-OH i C4 komponente komplementa («gubioci soli») (110). Također, među bolesnicima nije uočen antigen HLA-B8 za koji se smatra da je protektivan za nastanak KAH-e (155). Učestalost ovog antigena među zdravim ispitanicima u Hrvatskoj iznosi 6,4% (127). U našoj skupini, 15,91% ispitanika imalo je antigen HLA-B35, koji se prema ranije provedenoj studiji (15) češće nalazi u bolesnika s NKKAH-om u Hrvatskoj. Učestalost HLA-B35 u zdravih ispitanika u Hrvatskoj je 13,8% (127).

Mutacije gena *CYP21A2* u našoj skupini ispitanika nađene su na 91,49% alela (86/94 alela). Na 8,51% alela nije utvrđena niti jedna od ispitanih osam najčešćih mutacija. I u ranije provedenim studijama uočeno je kako bolesnici s NKKAH-om, za razliku od bolesnika s klasičnim oblikom KAH-e, imaju veću učestalost alela s neidentificiranim mutacijama (13%

alela (80); 27% alela (77)), iako se taj broj značajno smanjuje ukoliko se gen *CYP21A2* sekvencira (0,4% alela (35)). Kako je u našem istraživanju provedeno ispitivanje samo osam najčešćih mutacija gena *CYP21A2*, pretpostavljamo kako su bolesnici u kojih nisu nađene obje mutacije gena *CYP21A2* nosioci delecije ili neke druge rijetke, za sada neprepoznate mutacije na drugom alelu. Najčešća mutacija u nesrodnih bolesnika s NKAKH-om u našoj skupini ispitanika je mutacija u egzonu 7 (V281L), koja je nađena na 53,23% alela, odnosno u 83,87% ispitanika. To je u skladu s rezultatima većine studija provedenih na većem broju ispitanika (9, 17, 35, 74, 77, 80, 85, 100, 101, 102, 103, 147, 148). To govori u prilog pretpostavci da je povezanost ove mutacije s neklasičnim oblikom KAH-e vrlo stara. S obzirom da je povezanost otkrivena diljem svijeta, za očekivati je da će u budućnosti i rezultati za nove populacije govoriti o toj povezanosti.

Mutacija u egzonu 1 (P30L), karakteristična za neklasični oblik KAH-e, prvi je put među ostalim otkrivena i opisana u jedne naše bolesnice (bolesnica #10 (6)). Ova mutacija češće se nalazi među bolesnicima s NKKAH-om u nekim populacijama širom svijeta (*dio populacije u SAD* (6), *Meksiko* (104), *Japan* (105), *Slovenija* (106)), a u našoj skupini ispitanika nađena je u 16,13% bolesnika. Mutacija u egzonu 10 (P453S), koja se češće opisuje u bolesnika s NKAH-om u Grčkoj i nekim dijelovima SAD (98, 100) nađena je u samo jednog našeg ispitanika (bolesnica #24). Smanjena učestalost ove mutacije u našoj skupini ispitanika vjerojatno je rezultat toga što nisu svi bolesnici testirani za ovu mutaciju, te stoga ne možemo komentirati njenu učestalost među bolesnicima s NKKAH-om u Hrvatskoj.

Obzirom na specifičnosti raspodjele mutacija u pojedinim populacijama, bilo bi zanimljivo napraviti međunarodnu bazu podataka s mapiranjem raspodjele mutacija u pojedinim područjima kako bi se pratilo kretanje, odnosno širenje mutacija gena *CYP21A2* u svijetu.

Jedna ili više «umjereno teških/teških» mutacija nađena je u 57,5% naših bolesnika s NKKAH-om, odnosno u 70,97% nesrodnih bolesnika u kojih su dokazane obje mutacije gena *CYP21A2*. Dobiveni rezultati u skladu su s rezultatima drugih istraživanja u kojima više od polovice bolesnika s NKKAH-om nosi jednu «tešku/umjereno tešku» mutaciju (63% (85), 63,7% (35), 58,3% (77), ~ 40% (9), 45,5% (74), 53% (148)), no značajno je više nosioca «teških» mutacija u odnosu na istraživanje provedeno u Španjolskoj (145), prema kojem samo 36% ispitanice djece nosi jednu «tešku/umjereno tešku» mutaciju.

Usporedba raspodjele mutacija u naših ispitanika i raspodjele mutacija u različitim do sada provedenim studijama u drugim populacijama u svijetu prikazana je u Tablici 5.2.

Tablica 5.2. Raspodjela mutacija među nesrodnim ispitanicima s neklasičnim oblikom kongenitalne adrenalne hiperplazije u Hrvatskoj i usporedba raspodjela mutacija u različitim studijama u drugim populacijama u svijetu.

Mutacija % alela	Hrvatska N=31	Velika Britanija 1998. N=15 (80)	Brazil 2000. N=58 (77)	Njemačka 2000. N=11 (33)	Francuska 2001. N=56 (85)	Grčka 2001. N=28 (100)	Španjolska 2002. N=86 (145)	Srednja Europa 2005. N=35 (103)	Francuska 2009. N=124 (35)	SAD 2011. N=47 (147)	Italija 2011. N=55 (74)	Brazil 2013. N=114 (148)
<b>Ex7 (V281L)</b>	52,23	46,6	42,0	36,4	51,0	41,1	56,7	41, 7	55,9	57,7	69,1	67,0
<b>Ex1 (P30L)</b>	9,86	10,0	3,7	13,6	2,7	21,4	2,0	22,2	3,6	3,8	0,9	2,0
<b>Ex10 (P453S)<sup>1</sup></b>	1,61	0	3,7	4,5	6,2	14,3	3,3	NP	5,7	2,6	2,7	4,0
<b>Ex4 (I172N)</b>	11,29	16,7	4,7	4,5	5,4	7,1	1,3	8,3	5,2	9,0	5,5	0,008
<b>Int2</b>	16,13	13,3	7,5	18,2	14,3	5,4	2,7	NP	10,9	6,4	2,7	11,0
<b>Ex8<sub>318</sub> (Q318X)</b>	*	0	0	0	4,5	1,8	2,7	NP	4,4	3,8	0	3,0
<b>Ex8<sub>356</sub> (R356W)</b>	3,23	0	3,7	0	1,8	0	1,3	NP	1,2	1,3	1,8	2,0
<b>Skupina („cluster“ Ex6)</b>	0	13,3	0	0	0	0	0	NP	0,4	0	0,9	NP
<b>Ex3 (del8ntEx3)</b>	*	3,0	2,8	0	0	0	0	NP	0,4	0	0,9	NP

NP – nije poznato, \*mutacija Q318X je nađena samo u kombinaciji s drugim mutacijama na istom alelu, <sup>1</sup>učestalost među bolesnicima s NKKAH-om se ne može komentirati jer nisu svi bolesnici testirani za ovu mutaciju

Najčešća mutacija među ispitanim članovima obitelji je «blaga» mutacija u egzonu 7 (V281L) koja je nađena u 65,90% heterozigota. Oko 1/3 heterozigota nosi jednu «umjereno tešku» ili «tešku» mutaciju (13/44; 29,55%). U studiji koju su proveli Napolitano i sur. (152), 38,4% heterozigota (članova obitelji bolesnika s neklasičnim i klasičnim oblikom KAH-e) nosioci su jedne «teške» mutacije, 23,8% su nosioci «umjereno teške» mutacije, a 37,8% ispitanika nosi «blagu» mutaciju gena *CYP21A2*, pri čemu je mutacija u egzonu 7 nađena u 33,4% ispitanih heterozigota. U studiji koju su Ghizzoni i sur. (74) proveli među djecom s prematurnim pubarhama, od 50 djece koji su heterozigotni nosioci mutacije gena *CYP21A2*, 26% je imalo jednu «tešku» mutaciju, a 72% jednu «blagu» mutaciju. Najčešća mutacija u njihovoj skupini ispitanika bila je mutacija u egzonu 7, nađena u 64% heterozigota (74). Raspodjela mutacija među članovima obitelji uvelike ovisi o izboru skupine probanada; ukoliko se radi i o članovima obitelji bolesnika s klasičnim oblikom KAH-e učestalost «teških» i «umjereno teških» mutacija je značajno veća.

#### **5.4. Kliničke i biokemijske značajke bolesnika s NKKAH-om i heterozigota u ovisnosti o vrsti mutacije gena *CYP21A2***

Podaci o utjecaju genotipa na težinu kliničke slike, dob prilikom pojave simptoma hiperandrogenizma i koncentracija 17-OHP bazalno i nakon stimulacije s ACTH su varijabilni. U studiji Deneux i sur. (85) provedenoj kod 56 žena s NKKAH-om u Francuskoj nađene su više koncentracije 17-OHP bazalno i nakon stimulacije s ACTH, te veća učestalost primarne amenoreje u bolesnica koje su «složeni heterozigoti», odnosno nosioci jedne «umjereno teške/teške» mutacije. Između bolesnica s dvije «blage» mutacije i bolesnica koje nose jednu «umjereno tešku/tešku» mutaciju nije nađeno razlika u dobi prilikom postavljanja dijagnoze i stupnja hirsutizma (85). Bolesnici s jednom «teškom» mutacijom u studiji provedenoj u Brazilu ranije su manifestirali simptome hiperandrogenizma i imali su više koncentracije 17-OHP nakon stimulacije nego bolesnici s dvije «blage» mutacije (77). S druge strane, Speiser i sur. (9) u skupini ispitanika s NKKAH-om u SAD nisu uspjeli dokazati statistički značajnu razliku bazalnih koncentracija 17-OHP obzirom na genotip, iako je u bolesnica s jednom «teškom» mutacijom uočena veća učestalost oligomenoreje i hirsutima. U studiji provedenoj u 66 bolesnika s NKKAH-om u Italiji (31 djeteta i 35 odraslih ispitanika), dob pojave pubične dlakavosti i menarhe je bila niža, a razlika koštane i kronološke dobi, te odstupanje visine u odnosu na prosječnu visinu za dob viša u bolesnika s jednom

«teškom/umjereno teškom» mutacijom gena *CYP21A2* nego u bolesnika s dvije «blage» mutacije, dok nije uočena razlika obzirom na hirsutizam i učestalost poremećaja menstrualnog ciklusa. I u ovoj studiji koncentracije 17-OHP bazalno i nakon stimulacije bile su više u bolesnika s jednom «umjereno teškom/teškom» mutacijom nego u onih koji su nosioci dvije «blage» mutacije (146). Studijom provedenom među 161 ženom s NKKAH-om u Francuskoj, Bidet i sur. nisu našli razlike u kliničkoj slici obzirom na genotip, ali su također potvrdili statistički značajnu razliku u koncentracijama 17-OHP bazalno i nakon stimulacije između bolesnika koji su nosioci dvije «blage» mutacije u odnosu na one koji imaju jednu «tešku/umjereno tešku» mutaciju (35). U 55 djece s prenaturnim pubarhama i NKKAH-om u Italiji, Ghizzoni i sur. (74) našli su razliku samo u bazalnim koncentracijama 17-OHP, dok nije bilo drugih biokemijskih ili kliničkih razlika između bolesnika obzirom na genotip. Ezquieta i sur. u Španjolskoj nisu našli razlike u dobi pojave simptoma ili težini kliničke slike, ali su utvrdili značajno više koncentracije 17-OHP bazalno i nakon stimulacije s ACTH u bolesnika koji su nosioci jedne «teške/umjereno teške» mutacije. Prema njihovom istraživanju, koncentracije 17-OHP nakon stimulacije više od 151 nmol/l imaju 93% osjetljivost i 83% specifičnost detekcije nosioca «teške/umjereno teške» mutacije, iako postoji značajno preklapanje, te zaključuju kako dijagnostika na osnovu biokemijskih parametara nikako ne može zamijeniti gensku analizu (145). Ispitivanjem koje je obuhvatilo 114 bolesnika s NKKAH-om u Brazilu, Moura-Massari i sur. nisu našli razlike u dobi pojave simptoma, učestalosti prijevremene pubarhe, hirsutizma i poremećaja menstrualnog ciklusa između bolesnika koji su nosioci dvije «blage» mutacije i onih koji nose kombinaciju «blage» i «teške» mutacije, međutim, u njihovoj skupini ispitanika bolesnici koji nose kombinaciju «blage» i «teške» mutacije imali su značajno više bazalne koncentracije 17-OHP u odnosu na nosioce dvije «blage» mutacije (148).

U našoj skupini ispitanika s NKKAH-om nije nađena statistički značajna razlika između bolesnika koji nose dvije «blage» mutacije (skupina A) u odnosu na bolesnike koji nose jednu «blagu» i jednu «tešku/umjereno tešku» mutaciju (skupina B) obzirom na dob prilikom postavljanja dijagnoze, dob pubarhe, dobi menarhe, odstupanje tjelesne visine u odnosu na prosječnu visinu za dob prilikom postavljanja dijagnoze, te odstupanje koštane u odnosu na kronološku dob.

U našoj skupini ispitanika s NKKAH-om također nije nađena statistički značajna razlika u koncentracijama 17-OHP bazalno i nakon stimulacije s ACTH između skupine

bolesnika s dvije «blage» mutacije (skupina A) i bolesnika s jednom «blagom» i jednom «umjereno teškom/teškom» mutacijom (skupina B).

Genotip bolesnika #37 (jedini bolesnik u skupini C), koji nema nikakvih simptoma i otkriven je analizom članova obitelji, odgovara «klasičnom» obliku KAH-e, a porast koncentracije 17-OHP nakon stimulacije s ACTH u rasponu je koncentracija karakterističnih za NKKAH. Bolesnik je nosioci dvije «klasične» mutacije (Int2/I172N). Mutacija u Intronu 2 najčešće je povezana sa značajno smanjenom aktivnosti enzima 21-OH (manje od 5% enzimске aktivnosti), iako se povremeno opisuje i u bolesnika s blažom kliničkom slikom (9, 35, 43, 103, 148). Obzirom da mutacija u Intronu 2 dovodi do poremećaja u izrezivanju (engl. «*splicing*») pre-mRNA, čini se da se u nekih bolesnika proizvodi dovoljno funkcionalnog enzima 21-OH uslijed čega je klinička slika blaža od očekivane (156). U studiji Deneux i sur. (2001) mutacija u intronu 2 u kombinaciji s «blagom» mutacijom (12/56 ispitanica) bila je povezana s blažim fenotipom i nižim koncentracijama 17-OHP i androstendiona nego kombinacija «blage» i «umjereno teške» mutacije I172N (6/56 ispitanica) (85). Iako je mutacija I72N uglavnom vezana uz fenotip klasične KAH-e, u literaturi se opisuju bolesnici koje su, unatoč tome što su nosioci «umjereno teške» mutacije I172N u kombinaciji s drugom «teškom/umjereno teškom» mutacijom, imali fenotip koji odgovara NKKAH-i. Smatra se da ovi bolesnici zapravo predstavljaju intermedijarni klinički fenotip između neklasične i jednostavne virilizirajuće forme bolesti, odnosno potvrđuju kako u bolesnika s KAH-om postoji kontinuum kliničkih fenotipova u rasponu od blage neklasične forme bolesti do klasičnog oblika bolesti s gubitkom soli (35, 85, 130, 157). Razlike u fenotipu u bolesnika koji su nosioci dvije «klasične» mutacije mogle bi se objasniti utjecajem drugih gena ili čimbenika okoliša koji modificiraju kliničku sliku bolesti (16, 85, 130, 158).

Heterozigoti u našoj skupini ispitanika imali su vrlo varijabilan raspon bazalnih koncentracija 17-OHP kao i porast koncentracija 17-OHP nakon stimulacije s ACTH, od koncentracija koje se nađu u zdravih homozigota, do koncentracija koje se mogu naći u bolesnika s NKKAH-om. Iako postoji značajno preklapanje s koncentracijama 17-OHP heterozigota i zdravih homozigota, samo je u jednog heterozigota (majka bolesnice #30), koji je nosioc «teške» mutacije u Intronu 2, koncentracija 17-OHP nakon stimulacije bila je viša od 30 nmol/l, što odgovara porastu koncentracije 17-OHP u bolesnika s NKKAH-om (75).

U studiji koju su proveli Napolitano i sur. (152) kod 234 člana obitelji bolesnika s KAH-om u Italiji (161 heterozigot, 73 zdrava homozigota) nije nađena razlika u bazalnim



koncentracijama 17-OHP između homozigota i heterozigota, no heterozigoti su u njihovoj skupini ispitanika imali statistički značajno više koncentracije 17-OHP nakon stimulacije s ACTH. Prema njihovim rezultatima koncentracija 17-OHP nakon stimulacije od 9,09 nmol/l (3,0 ng/dl) predstavlja graničnu koncentraciju 17-OHP (engl. «*cut-off*») koja omogućuje razlikovanje homozigota i heterozigota (osjetljivost 90%, specifičnost 74,3%). Obzirom na nisku specifičnost, autori navode kako nije moguće u potpunosti razlučiti heterozigote i homozigote samo na osnovu testa stimulacije s ACTH, ali smatraju kako daljnju analizu gena *CYP21A2* u slučaju kliničke primjene (prenatalna dijagnostika) treba provoditi samo u onih ispitanika čija je koncentracije 17-OHP nakon stimulacije veća od 9,09 nmol/l.

U našoj skupini ispitanika nije nađena statistički značajna razlika u koncentracijama 17-OHP između heterozigota i zdravih homozigota, kako bazalno, tako i nakon stimulacije s ACTH.

Admoni i sur. (159) u studiji provedenoj u Izraelu (66 ispitanika) našli su više koncentracije 17-OHP nakon stimulacije s ACTH u heterozigotnih nosioca mutacije V281L u odnosu na nosioce drugih mutacija gena *CYP21A2*. U 242 heterozigota koje su ispitali Bidet i sur. u Francuskoj (35), te 59 heterozigota koje su ispitali Bachega i sur. u Brazilu (79) nije nađena razlika u koncentracijama 17-OHP bazalno i nakon stimulacije među ispitanicima koji su nosioci «blage» u odnosu na «tešku/umjereno tešku» mutaciju. I u našem istraživanju potvrdili smo ove rezultate; nije nađena statistički značajna razlika koncentracija 17-OHP bazalno ( $p=0,793$ ) i nakon stimulacije ( $p=0,726$ ) između heterozigota koji su nosioci «blage» u odnosu na one koji su nosioci «teške/umjereno teške» mutacije.

## **5.5. Fertilitet u bolesnika s NKKAH-om. Potreba prenatalne dijagnostike.**

Bolesnice s NKKAH-om u odrasloj dobi mogu imati poremećenu funkciju ovarija, koja se očituje neredovitim menstruacijskim ciklusima, anovulacijom i infertilitetom (9, 80, 160, 161, 162), no studije provedene na većem broju ispitanica pokazale su da je fertilitet uglavnom zadovoljavajući (30, 31, 32, 33, 34, 35, 163), iako je učestalost spontanih pobačaja bez primjene terapije veća (36). Funkcija gonada u muških bolesnika uglavnom je normalna;

oligospermija, koja se može naći u nekih bolesnika, izgleda da nema značajnijeg utjecaja na njihov fertilitet (23, 37). U manjeg broja muških bolesnika sa smanjenom fertilnošću došlo je do spontanog začeća nakon uvođenja terapije hidrokortizonom (164, 165). U bolesnika s NKKAH-om uglavnom se ne razvija ektopično adrenalno tkivo u testisima (TART; engl. «*testicular adrenal rest tissue*»), koje se opisuje u bolesnika s klasičnim oblikom KAH-e i može uzrokovati infertilitet i nastanak tumorskih tvorbi u testisima (166). U literaturi je do sada opisan samo jedan bolesnik s NKKAH-om u kojeg je došlo do razvoja benignih tumorskih tvorbi u testisima koje su histološki odgovarale ektopičnom adrenalnom tkivu (38).

U našoj skupini od 18 ispitanika generativne dobi, njih 16 je pokušalo ostvariti potomstvo (osam muških i osam ženskih ispitanika). Svi muški bolesnici i 6/8 ženskih bolesnica otkriveni su analizom članova obitelji nakon postavljanja sumnje na hipersekreciju androgena u njihove djece. Samo su dvije bolesnice otkrivene zbog simptoma hipersekrecije androgena. Svih 16 ispitanika ostvarilo je potomstvo; ukupno je rođeno 26 djece, od čega su 53,8% djece bolesnici s različitim oblicima KAH-e (sedmero djece su gubioci soli, troje djece ima jednostavni virilizirajući oblik bolesti, a četvero djece boluje od NKKAH-e). Veliku učestalost djece s KAH-om među potomstvom naših bolesnika s NKKAH-om možemo objasniti pristranošću pri izboru ispitanika (engl. „*selection bias*“), obzirom da je 87,5% bolesnika generativne dobi u našoj studiji upravo otkriveno analizom članova obitelji.

Svi muški ispitanici bili su fertilni. Sve ženske ispitanice ostvarile su spontane trudnoće. Dvije bolesnice su otežano začele, ali obje su ostvarile trudnoće bez uvođenja glukokortikoidne terapije. Samo tri bolesnice generativne dobi su uzimale glukokortikoidnu terapiju; u jedne je terapija uvedena prije trudnoće, u druge je terapija uvedena u 12. tjednu trudnoće i nastavljena je nakon poroda, a treća bolesnica je prekinula terapiju u 17. godini života, tri godine prije začeća. Nije bilo podataka o spontanim pobačajima.

Možemo zaključiti da je fertilitet u našoj skupini ispitanika s NKKAH-om bio zadovoljavajući. Poteškoće začeća bile su prisutne samo u malog broja ispitanica i u svih bolesnica su bile otklonjene prije primjene glukokortikoidne terapije.

Među potomstvom žena s NKKAH-om veći je bio broj muške djece (osam muških i četiri ženska djeteta), što je u suprotnosti sa studijom koju su, također na malom uzorku ispitanika, proveli Hagenfeldt i sur. (167). U njihovom uzorku ispitanika žene s NKKAH-om rađale su manje muške djece. Ukupno je u našem uzorku bolesnika broj muške djece bio nešto veći (14 muške i 12 ženske djece).

Kako je prevalencija heterozigota za mutaciju gena *CYP21A2* u općoj populaciji 1:50 (168), rizik za rađanje djeteta s KAH-om je 1:200, ukoliko je jedan od roditelja bolesnik s NKKAH-om, a status partnera nije poznat. Ukoliko je jedan partner bolesnik s NKKAH-om i nosi jednu «tešku/umjereno tešku» mutaciju, a drugi partner heterozigotni nosioc «teške/umjereno teške» mutacije, rizik za rađanje djeteta s nekim od oblika KAH-e (klasični ili neklasični) iznosi 50%. Pri tome rizik za rađanje djeteta s klasičnim oblikom KAH-e je 1:4; a rizik za rađanje ženskog djeteta s klasičnim oblikom KAH-e je 1:8.

U našoj populaciji ispitanika, više od polovice bolesnika s NKKAH-om (57,5%) nosi jednu ili dvije «umjereno teške/teške» mutacije. Učestalost nosioca mutacije za KAH, bilo klasični ili neklasični, prema studiji koju su proveli Baumgartner-Parzer i sur. (128) u našoj populaciji doseže čak 10%, što ukazuje na značajan rizik za rađanje djeteta oboljelog od KAH-e ukoliko je roditelj bolesnik s NKKAH-om.

Našim istraživanjem pokazali smo kako na osnovu rezultata testa stimulacije s ACTH nije moguće razlikovati zdrave homozigote i heterozigote, kao niti radi li se o heterozigotnom nosiocu «blage» ili «umjereno teške/teške» mutacije. Također, u populaciji bolesnika s NKKAH-om nije moguće razlikovati radi li se o nosiocu dvije «blage» mutacije ili nosiocu «blage» i «umjereno teške/teške» mutacije.

Smatramo stoga da u svih bolesnika s NKKAH-om treba učiniti genotipizaciju kako bi se utvrdilo radi li se o nosiocu mutacije koja može uzrokovati «klasični» oblik KAH-e. Ako bolesnik nosi jednu «tešku/umjereno tešku» mutaciju, u slučaju planirane trudnoće, preporuča se u partnera bolesnika učiniti genotipizaciju kako bi se ispitalo radi li se o heterozigotnom nosiocu «teške/umjereno teške» mutacije gena *CYP21A2*. Ukoliko i bolesnik i partner nose «tešku/umjereno tešku» mutaciju, ili ukoliko nije poznat genotip partnera, preporučamo započeti prenatalnu terapiju do pristizanja rezultata genotipizacije partnera ili rezultata prenatalne dijagnostike, obzirom na rizik rađanja djeteta s klasičnim oblikom kongenitalne adrenalne hiperplazije. U svih bolesnika s NKKAH-om nakon postizanja generativne dobi potrebno je provesti genetsko savjetovanje.

## 6. ZAKLJUČCI

### ***(1) Kliničke osobine bolesnika s NKKAH-om i heterozigota***

Neovisno o načinu postavljanja dijagnoze (analizom članova obitelji ili zbog simptoma hiperandrogenizma), 73,47% bolesnika s NKKAH-om imalo je neki od simptoma hiperandrogenizma. Djevojčice s NKKAH-om imale su statistički značajno raniju dob pojave pubarhe u odnosu na muške ispitanike ( $p=0,004$ ). Prilikom postavljanja dijagnoze, dječaci s NKKAH-om bili su statistički značajno viši u odnosu na prosječnu visinu za dob ( $p=0,023$ ). Nije nađena razlika u kliničkoj slici između bolesnika koji nose dvije «blage» mutacije u odnosu na bolesnike koji nose jednu «blagu» i jednu «tešku/umjereno tešku» mutaciju.

### ***(2) Biokemijske osobine bolesnika s NKKAH-om i heterozigota***

Bazalna koncentracija 17-OHP koja predstavlja graničnu vrijednost (engl. «cut-off») s najboljom osjetljivošću i specifičnošću u našoj skupini ispitanika je 8,8 nmol/l (osjetljivost 95,1%, specifičnost 92,6%). Koncentracija 17-OHP nakon stimulacije s ACTH koja predstavlja graničnu vrijednost s najboljom osjetljivošću i specifičnošću je 39,2 nmol/l (osjetljivost 97,1%, specifičnost 100%). U svih ispitanika s bazalnom koncentracijom 17-OHP višom od 8,8 nmol/l nužno je učiniti daljnju dijagnostičku obradu zbog sumnje na neklasični oblike KAH-e, a u svih ispitanika s koncentracijom 17-OHP nakon stimulacije s ACTH višom od 39,2 nmol/l nužno je učiniti analizu mutacija gena *CYP21A2* radi potvrde dijagnoze NKKAH-e.

Među bolesnicima koji nose dvije «blage» mutacije i bolesnicima s jednom «blagom» i jednom «umjereno teškom/teškom» mutacijom nije nađena statistički značajna razlika u koncentracijama 17-OHP bazalno i nakon stimulacije s ACTH. Također nije nađena statistički značajna razlika u koncentracijama 17-OHP bazalno i nakon stimulacije s ACTH između skupina simptomatskih i asimptomatskih bolesnika.

Koncentracije 17-OHP bazalno i nakon stimulacije s ACTH u heterozigota pokazale su značajno preklapanje sa zdravim homozigotima, odnosno na osnovu koncentracija 17-OHP nije moguće otkriti heterozigotne nosioce mutacije gena *CYP21A2*. Nije nađena statistički značajna razlika koncentracija 17-OHP bazalno i nakon stimulacije s ACTH između heterozigota koji su nosioci «blage» u odnosu na one koji su nosioci «teške/umjereno teške» mutacije.

### **(3) Sustav HLA i mutacije gena *CYP21A2* u bolesnika s NKKAH-om i heterozigota**

Mutacije gena *CYP21A2* u bolesnika s NKKAH-om u Hrvatskoj nađene su na 91,49% alela; u 85,11% bolesnika nađene su dvije mutacije gena *CYP21A2* (75,5% «složeni» heterozigoti; 22,5% homozigoti). Najčešća mutacija gena *CYP21A2* među nesrodnim bolesnicima s NKKAH-om u kojih su dokazane obje mutacije gena *CYP21A2* je mutacija u egzonu 7 (V281L) (83,87% bolesnika; 53,23% alela). Jedna «umjereno teška/teška» mutacija (intron 2 (nt 656 A/C>G), egzon 3 (8-nt del), egzon 4 (I172N), egzon 8<sub>318</sub> (Q318X) i egzon 8<sub>356</sub> (R356W)) nađena je u 70,97% nesrodnih bolesnika, što je u skladu s rezultatima većine drugih istraživanja u svijetu.

Najčešća mutacija među heterozigotima (65,90%) je «blaga» mutacija u egzonu 7 (V281L). U 29,55% heterozigota nađena je «umjereno teška» ili «teška» mutacija (intron 2 (nt 656 A/C>G), egzon 3 (8-nt del), egzon 4 (I172N), egzon 8<sub>318</sub> (Q318X) i egzon 8<sub>356</sub> (R356W)).

U našoj skupini ispitanika s NKKAH-om potvrđena je statistički značajna povezanost ( $p < 0,0001$ ) HLA-B14 s mutacijom u egzonu 7 (V281L), a svi bolesnici pozitivni za HLA-B14, kao i haplotip HLA-B14,-DR1 nose mutaciju u egzonu 7 (V281).

### **(4) Prenatalno/prekonceptijsko savjetovanje i dijagnostika**

Obzirom da 70,97% bolesnika s NKKAH-om u Hrvatskoj nosi jednu ili dvije «umjereno teške/teške» mutacije, smatramo da u svih bolesnika s NKKAH-om treba učiniti analizu mutacija gena *CYP21A2*. Ako bolesnik nosi jednu «tešku/umjerno tešku» mutaciju, preporuča se odrediti mutacije gena *CYP21A2* u partnera bolesnika. Ukoliko i bolesnik i partner nose «tešku/umjerno tešku» mutaciju, ili ukoliko genotip partnera nije poznat, preporučamo započeti prenatalnu terapiju do pristizanja rezultata analize mutacija gena

*CYP21A2* kod partnera bolesnika ili pristizanja rezultata prenatalne dijagnostike. U svih bolesnika s NKKAH-om generativne dobi potrebno je provesti genetsko savjetovanje.

## 7.SAŽETAK

UVOD: Neklasični oblik kongenitalne adrenalne hiperplazije (NKKAH) zbog djelomičnog manjka enzima 21-hidroksilaze uzrokovan je mutacijama gena *CYP21A2* na kromosomu 6p21.3. Cilj istraživanja je utvrditi učestalost mutacija gena *CYP21A2* u bolesnika s NKKAH-om u Hrvatskoj, ispitati odnos genotipa, fenotipa i koncentracija 17-hidroksiprogesterona (17-OHP), te utvrditi potrebu provođenja prenatalne dijagnostike.

ISPITANICI I METODE: Ispitano je 49 bolesnika (38 nesrodnih) s NKKAH-om (31 ženskih/18 muških), te 64 člana uže obitelji. Procijenjeni su klinički znakovi hipersekrecije androgena, izmjerene koncentracije 17-OHP bazalno i nakon stimulacije s ACTH, tipizirani geni HLA i ispitane mutacije gena *CYP21A2*.

REZULTATI: Najčešća mutacija u našoj skupini ispitanika je mutacija u egzonu 7 (83,87% bolesnika), a 70,97% bolesnika nosi jednu «umjereno tešku/tešku» mutaciju. Mutacija u egzonu 7 povezana je s HLA-B14 ( $p < 0,0001$ ). Nije utvrđena korelacija genotipa s kliničkom slikom i koncentracijama 17-OHP. Granične vrijednosti koncentracija 17-OHP s najboljom osjetljivošću i specifičnošću su 8,8 nmol/l za bazalnu i 39,2 nmol/l za koncentraciju 17-OHP nakon stimulacije s ACTH.

ZAKLJUČAK: Klinička slika i koncentracije 17-OHP ne pokazuju korelaciju s genotipom. Stoga je u svih bolesnika nužno ispitati mutacije gena *CYP21A2*. Zbog rizika za rađanje djeteta s klasičnim oblikom KAH-e, nosiocima «umjereno teške/teške» mutacije potrebno je pružiti genetsko savjetovanje i ispitati mutacije gena *CYP21A2* kod partnera bolesnika.

## 8. SUMMARY

**BACKGROUND:** Nonclassical congenital adrenal hyperplasia (NCCAH) due to partial 21-hydroxylase deficiency is caused by mutations of the *CYP21A2* gene located on chromosome 6p21.3. The aim of this study was to determine *CYP21A2* gene mutations frequency among Croatian NCCAH patients, the correlation between genotype, phenotype and 17-hydroxyprogesterone (17-OHP) levels and to evaluate the need for prenatal diagnosis.

**SUBJECTS AND METHODS:** A cohort of 49 patients (38 unrelated) with NCCAH (31 female/18 male) and 64 relatives was studied. The subjects were evaluated for virilization signs, basal and ACTH-stimulated 17-OHP levels were measured and HLA typing and *CYP21A2* gene molecular analysis were performed.

**RESULTS:** The commonest mutation in our study group is Exon 7 (83.87%) and 70.87% patients carry one «moderate/severe» mutation. Exon 7 mutation correlated with HLA-B14 ( $p < 0.0001$ ). Genotype did not correlate with phenotype and 17-OHP levels. The 17-OHP cutoff levels of best sensitivity and specificity were 8.8 nmol/l for baseline and 39.2 nmol/l for ACTH stimulated 17-OHP levels.

**CONCLUSION:** Phenotype and 17-OHP levels do not correlate with genotype. Thus molecular analysis of *CYP21A2* gene should be done in all patients. Due to the risk of birthing a child with classical CAH, all carriers of one «moderate/severe» mutation should undergo genetic counselling and *CYP21A2* gene mutations analysis in the patients' partners.

The title of the thesis: CLINICAL, BIOCHEMICAL AND MOLECULAR CHARACTERISTICS OF THE PATIENTS WITH NONCLASSICAL CONGENITAL ADRENAL HYPERPLASIA DUE TO 21-HYDROXYLASE DEFICIENCY

Nevena Krnić

Godina obrane disertacije: 2014.



## 9. POPIS LITERATURE

1. Bongiovanni AM, Root AM. The adrenogenital syndrome. *N Engl J Med* 1963;268:1283-1289.
2. Higashi Y, Yoshioka H, Yamane M, Gotoh O, Fujii-Kuriyama Y. Complete nucleotide sequence of two steroid 21-hydroxylase genes tandemly arranged in human chromosome: a pseudogene and a genuine gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83(9):2841-2845.
3. Decourt J, Jayle MF, Baulieu E. Clinically late virilism with excretion of pregnanetriol and insufficiency of cortisol production. *Ann Endocrinol (Paris)* 1957;18(3):416-422.
4. New MI, Lorenzen F, Pang S, Gunczler P, Dupont P, Levine LS. «Acquired» adrenal hyperplasia with 21-hydroxylase deficiency is not the same genetic disorder as congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 1979;48:356-359.
5. Speiser PW, New MI, White PC. Molecular genetic analysis of nonclassic steroid 21-hydroxylase deficiency associated with HLA-B14,DR1. *N Engl J Med* 1988;319(1):19-23.
6. Tusie-Luna MT, Speiser PW, Dumic M, New MI, White PC. A mutation (Pro-30 to Leu) in CYP21 represents a potential nonclassic steroid 21-hydroxylase deficiency allele. *Mol Endocrinol* 1991;5:682-685.
7. Helmberg A, Tusie-Luna MT, Tabarelli M, Kofler R, White PC. R339H and P453S: CYP21 mutations associated with nonclassic steroid 21-hydroxylase deficiency that are not apparent gene conversions. *Mol Endocrinol* 1992;6(8):1318-1322.
8. Kamrath C, Hochberg Z, Hartmann MF, Remer T, Wudy SA. Increased activation of the alternative «backdoor» pathway in patients with 21-hydroxylase deficiency: evidence from urinary steroid hormone analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97(3):E367-375.
9. Speiser PW, Knochenhauser ES, Dewailly D, Fruzzetti F, Marcondes JA, Azziz R. A multicenter study of women with nonclassical congenital adrenal hyperplasia: relationship between genotype and phenotype. *Mol Genet Metab* 2000;71:527-534.
10. Speiser PW. Congenital adrenal hyperplasia owing to 21-hydroxylase deficiency. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2001;30(1):31-59.
11. New MI. An Update of congenital adrenal hyperplasia. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1038:14-43.
12. Speiser PW, White PC. Congenital adrenal hyperplasia. *N Engl J Med* 2003;349(8): 776-788.

13. Merke DP, Bornstein SR. Congenital adrenal hyperplasia. *Lancet* 2005; 365(9477):2125-2136.
14. Prader A. Genital findings in the female pseudo-hermaphroditism of the congenital adrenogenital syndrome; morphology, frequency, development and heredity of the different genital forms. *Helv Paediatr Acta* 1954;9(3):231-248.
15. Speiser PW, Dupont B, Rubinstein P, Piazza A, Kastelan A, New MI. High frequency of nonclassical steroid 21-hydroxylase deficiency. *Am J Hum Genet* 1985;37:650-667.
16. Speiser PW, Dupont J, Zhu D, Serrat J, Buegeleisen J, Tusie-Luna MT, Lesser M, New MI, White PC. Disease expression and molecular genotype in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Invest* 1992;90:584-595.
17. New MI. Extensive clinical experience: nonclassical 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91(11):4205-4214.
18. Witchel SF, Azziz R. Nonclassical congenital adrenal hyperplasia. *Int J Pediatr Endocrinol* 2010;2010:625105.doi:10.1155/2010/625105.
19. Moran C, Azziz R, Carmina E, Dewailly D, Fruzzetti F, Ibañez L, Knochelhauer ES, Marcondes JA, Mendonca BB, Pignatelli D, Pugeat M, Rohmer V, Speiser PW, Witchel SF. 21-Hydroxylase-deficient nonclassic adrenal hyperplasia is a progressive disorder: a multicenter study. *Am J Obstet Gynecol* 2000;183(6):1468-1474.
20. Pijnenburg-Kleizen KJ, Borm GF, Otten BJ, Schott DA, van den Akker EL, Stokvis-Brantsma WH, Voorhoeve PG, Bakker B, Claahsen-van der Grinten HL. Absence of clinically relevant growth acceleration in untreated children with non-classical congenital adrenal hyperplasia. *Horm Res Paediatr* 2012;77(3):164-169.
21. New MI, Gertner JM, Speiser PW, Del Balzo P. Growth and final height in classical and nonclassical 21-hydroxylase deficiency. *J Endocrinol Invest* 1989;12:91-95.
22. David M, Sempé M, Blanc M, Nicolino M, Forest MG, Morel Y. Final height in 69 patients with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Arch Pediatr* 1994;1(4):363-367.
23. White PC, Speiser PW. Long-term consequences of childhood-onset congenital adrenal hyperplasia. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2002;2(16):273-288.
24. Otten BJ, Stikkelbroeck MM, Claahsen-van der Grinten HL, Hermus AR. Puberty and fertility in congenital adrenal hyperplasia. *Endocr Dev* 2005;8:54-66.
25. Lin-Su K, Nimkarn S, New MI. Congenital adrenal hyperplasia in adolescents: diagnosis and management. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1135:95-98.

26. Jaresch S, Kornely E, Kley HK, Schlaghecke R. Adrenal incidentaloma and patients with homozygous or heterozygous congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 1992;74:685-682.
27. Ravichandran R, Lafferty F, McGinniss MJ, Taylor HC. Congenital adrenal hyperplasia presenting as massive adrenal incidentalomas in the sixth decade of life: report of two patients with 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81:1776-1779.
28. Patócs A, Tóth M, Barta C, Sasvári-Székely M, Varga I, Szücs N, Jakab C, Gláz E, Rácz K. Hormonal evaluation and mutation screening for steroid 21-hydroxylase deficiency in patients with unilateral and bilateral adrenal incidentalomas. *Eur J Endocrinol* 2002;147(3):349-355.
29. Nigawara T, Kageyama K, Sakihara S, Takayasu S, Kawahara M, Imai A, Ohyama C, Usui T, Sasano H, Suda T. A male case of nonclassical 21-hydroxylase deficiency first manifested in his sixties with adrenocortical incidentaloma. *Endocrinol J* 2008; 55(2):291-297.
30. Birnbaum MD, Rose LI. Late onset adrenocortical hydroxylase deficiencies associated with menstrual dysfunction. *Obstet Gynecol* 1984;63:445-451.
31. Feldman S, Billaud L, Thalabard JC, Raux-Demay MC, Mowszowicz I, Kuttan F, Mauvais-Jarvis P. Fertility in women with late-onset adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1992;74:635-639.
32. Kuhnle U, Bullinger M, Schwarz HP. The quality of life in adult female patients with congenital adrenal hyperplasia: a comprehensive study of the impact of genital malformations and chronic disease on female patients life. *Eur J Pediatr* 1995;154: 708-716.
33. Krone N, Wachter I, Stefanidou M, Roscher AA, Schwarz HP. Mothers with congenital adrenal hyperplasia and their children: outcome of pregnancy, birth and childhood. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2001;55:523-529.
34. Dumic M, Ille J, Zunec R, Plavsic V, Francetic I, Skrabic V, Janjanin N, Spehar A, Wei J, Wilson RC, New MI. Nonclassic 21-Hydroxylase Deficiency in Croatia. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2004;17(2):157-64.
35. Bidet M, Bellanné-Chantelot C, Galand-Portier MB, Golmard JL, Tardy V, Billaud L, Laborde K, Coussieu C, Morel Y, Vaury C, Golmard JL, Claustre A, Mornet E, Chakhtoura Z, Mowzowicz I, Bachelot A, Touraine P, Kuttann F. Clinical and Molecular Characterization of a Cohort of 161 Unrelated Women with Nonclassical Congenital

- Adrenal Hyperplasia Due to 21-Hydroxylase Deficiency and 330 Family Members. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94(5):1570-1578.
36. Bidet M, Bellanné-Chantelot C, Galand-Portier MB, Golmard JL, Tardy V, Morel Y, Clauin S, Coussieu C, Bodou P, Mowzowicz I, Bachelot A, Touraine P, Kuttenn F. Fertility in Women with Nonclassical Congenital Adrenal Hyperplasia due to 21-Hydroxylase Deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95(3):1182-1190.
  37. Pinkas H, Fuchs s, Klipper-Aurbach Y, Zvulunov A, Raanani H, Mimouni G, Fisch B, Weintrob N. *Fertil Steril* 2010;93(6):1887-1891.
  38. Sha YW, Song YQ, Zheng LK, Ma XM, Yang D, Huang P, Han B. Congenital adrenal hyperplasia complicated by testicular adrenal rest tumors: one-case clinical analysis. *Zhonghua Nan Ke Yue* 2010;16(9):816-821.
  39. Lee PA, Rosenwaks Z, Urban MD, Migeon CJ, Bias WD. Attenuated forms of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1982;55(5):866-871.
  40. Dumic M, Brkljacic L, Mardesic D, Plavsic V, Lukenda M, Kastelan A. 'Cryptic' form of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency in the Yugoslav population. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1985;109(3):386-392.
  41. Nandagopal R, Sinaii N, Avila NA, Van Ryzin C, Chen W, Finkelstein GP, Mehta SP, McDonnell NB, Merke DP. Phenotypic profiling of parents with cryptic nonclassic congenital adrenal hyperplasia: findings in 145 unrelated families. *Eur J Endocrinol* 2011;164(6):977-984.
  42. Young J, Tardy V, de la Perrière AB, Bachelot A, Morel Y; French Society of Endocrinology. Detection and management of late-onset 21-hydroxylase deficiency in women with hyperandrogenism. *Ann Endocrinol (Paris)* 2010;71(1):14-18.
  43. Kuttenn F, Couillin P, Girard F, Billaud L, Vincens M, Boucek-kine C, Thalabard JC, Maudelonde T, Spritzer P, Mowszowcz I. Late-onset adrenal hyperplasia in hirsutism. *N Engl J Med* 1985;313:224-231.
  44. Killeen AA, Hanson NO, Eklund R, Cairl CJ, Eckfeldt JH. Prevalence of nonclassical congenital adrenal hyperplasia among women self-referred for electrolytic treatment of hirsutism. *Am J Med Genet* 1992;42:197-200.
  45. Baron JJ, Baron J. Differential diagnosis of hirsutism in girls between 15-19 years old. *Ginekol Pol* 1993;64:267-269.

46. Salinas Vert I, Audi Parera L, Granada Ybern ML, Lucas Martin A, Pizarro Lozano E, Foz Sala M, Sanmarti Sala A. Defects of adrenal steroidogenesis in patients with hirsutism. *Med Clin (Barc)* 1998;110:171-176.
47. Erel CT, Senturk LM, Oral E, Mutlu H, Colgar U, Seyisoglu H, Ertungealp E. Results of the ACTH stimulation test in hirsute women. *J Reprod Med* 1999;44:247-252.
48. Azziz R, Sanchez LA, Knochenhauer ES, Moran C, Lazenby J, Stephens KC, Taylor K, Boots LR. Androgen excess in women: experience with over 1000 consecutive patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89(2):453-462.
49. Yarman S, Dursun A, Oguz F, Alagol F. The prevalence, molecular analysis and HLA typing of late-onset 21-hydroxylase deficiency in Turkish woman with hirsutism and polycystic ovary. *Endocr J* 2004;51(1):31-36.
50. Escobar-Morreale HF, Sanchón R, San Millán JL. A prospective study of the prevalence of nonclassical congenital adrenal hyperplasia among women presenting with hyperandrogenic symptoms and signs. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93(2):527-533.
51. Carmina E, Rosato F, Janni A, Rizzo M, Longo RA. Extensive clinical experience: relative prevalence of different androgen excess disorders in 950 women referred because of clinical hyperandrogenism. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91(1):2-6.
52. Trakakis E, Rizos D, Loghis C, Chryssikopoulos A, Spyropoulou M, Salamalekis E, Simeonides G, Vagapoulos V, Salamalekis G, Kassanos D. The prevalence of non-classical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency in Greek women with hirsutism and polycystic ovary syndrome. *Endocr J* 2008;55(1):33-39.
53. Trakakis E, Papadavid E, Dalamaga M, Koumaki D, Stavrianeas N, Rigopoulos D, Creatsas G, Kassanos D. Prevalence of non classical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency in Greek women with acne: a hospital-based cross-sectional study. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2013;27(11):1448-1451.
54. Lucky AW, Rosenfield RL, McGuire J, Rudy S, Helke J. Adrenal androgen hyperresponsiveness to adrenocorticotrop in women with acne and/or hirsutism: adrenal enzyme defect and exaggerated adrenarche. *J Clin Endocrinol Metab* 1986; 62:840-848.
55. Ostlere LS, Rumsby G, Holownia P, Jacobs HS, Rustin MH, Honour JW. Carrier status for steroid 21-hydroxylase deficiency is only one factor in the variable phenotype of acne. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1988;48:209-215.
56. De Raeve L, De Schepper J, Smits J. Prepubertal acnae: a cutaneous marker of androgen excess? *J Am Acad Dermatol* 1995;32(2Pt1):181-184.

57. Caputo V, Fiorella S, Curiale S, Caputo A, Niceta M. Refractory acne and 21-hydroxylase deficiency in a selected group of female patients. *Dermatology* 2010;220(2):121-127.
58. Placzek M, Degitz K, Schmidt H, Plewig G. Acne fulminans in late-onset congenital adrenal hyperplasia. *Lancet* 1999;2:739-740.
59. Degitz K, Placzek M, Arnold B, Schmidt H, Plewig G. Congenital adrenal hyperplasia and acne in male patients. *Br J Dermatol* 2003;148:1263-1266.
60. Sharquie KE, Noaimi AA, Saleh BO, Anbar ZN. The frequency of 21-alpha hydroxylase enzyme deficiency and related sex hormones in Iraqi healthy male subjects versus patients with acne vulgaris. *Saudi Med J* 2009;30(12):1547-1550.
61. Bernal González C, Fernández Salas C, Martínez S, Ezquieta Zubicaray B. Premature androgenetic alopecia in adult male with nonclassic 21-OH deficiency. A novel nonsense CYP21A2 mutation (Y336X) in 2 affected siblings. *Med Clin (Barc)* 2006;127(16):617-621.
62. Gonzalez ME, Cantatore-Francis J, Orlow SJ. Androgenetic alopecia in the pediatric population: a retrospective review of 57 patients. *Br J Dermatol* 2010;163(2):378-385.
63. Granoff AB, Chasalow FI, Blethen SL. 17-Hydroxyprogesterone responses to adrenocorticotropin in children with premature adrenarche. *J Clin Endocrinol Metab* 1985;60(3):409-415.
64. Morris AH, Reiter EO, Geffner ME, Lippe BM, Itami RM, Mayes S. Absence of nonclassical congenital adrenal hyperplasia in patients with precocious adrenarche. *J Clin Endocrinol Metab* 1989;69(4):709-715.
65. Temeck JW, Pang SY, Nelson C, New MI. Genetic defects of steroidogenesis in premature pubarche. *J Clin Endocrinol Metab* 1987;64:609-17.
66. Leite MV, Mendonça BB, Arnhold IJ, Estefan V, Nunes C, Nicolau W, Bloise W. Identification of nonclassical 21-hydroxylase deficiency in girls with precocious pubarche. *J Endocrinol Invest* 1991;14(1):11-15.
67. del Balzo P, Borrelli P, Cambiaso P, Danielli E, Cappa M. Adrenal steroidogenic defects in children with precocious pubarche. *Horm Res* 1992;37:180-184.
68. Hawkins LA, Chasalow FI, Blethen SL. The role of adrenocorticotropin testing in evaluating girls with premature adrenarche and hirsutism/oligomenorrhea. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 74(2):284-253.
69. Balducci R, Boscherini B, Mangiantini A, Morellini M, Toscano V. Isolated precocious pubarche: an approach. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;79(2):582-589.

70. Ibáñez L, Bonnin MR, Zampolli M, Prat N, Alia PJ, Navarro MA. Usefulness of an ACTH test in the diagnosis of nonclassical 21-hydroxylase deficiency among children presenting with premature pubarche. *Horm Res* 1995;44(2):51-56.
71. Likitmaskul S, Cowell CT, Donaghue K, Kreutzmann DJ, Howard NJ, Blades B, Silink M. "Exaggerated adrenarche" in children presenting with premature adrenarche. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1995;42(3):265-272.
72. Dacou-Voutetakis C, Dracopoulou M. High incidence of molecular defects of the CYP21 gene in patients with premature adrenarche. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84(5):1570-1574.
73. Armengaud JB, Charkaluk ML, Trivin C, Tardy V, Bréart G, Brauner R, Chalumeau M. Precocious pubarche: distinguishing late-onset congenital adrenal hyperplasia from premature adrenarche. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94(8):2835-2840.
74. Ghizzoni L, Cappa M, Vottero A, Ubertini G, Carta D, Di Iorgi N, Gasco V, Marchesi M, Raggi V, Ibba A, Napoli F, Massimi A, Maghnie M, Loche S, Porzio O. Relationship of CYP21A2 genotype and serum 17-hydroxyprogesterone and cortisol levels in a large cohort of Italian children with premature pubarche. *Eur J Endocrinol* 2011;165(2):307-314.
75. New MI, Lorenzen F, Lerner AJ, Kohn B, Oberfield SE, Pollack MS, Dupont B, Stoner E, Levy DJ, Pang S, Levine LS. Genotyping steroid 21-hydroxylase deficiency: hormonal reference data. *J Clin Endocrinol Metab* 1983;57:320-326.
76. Azziz R, Zacur HA. 21-Hydroxylase deficiency in female hyperandrogenism: screening and diagnosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1989;69(3):577-584.
77. Bachega TA, Billerbeck AE, Madureira G, Marcondes JA, Longui CA, Leite MV, Arnhold IJ, Mendonca BB. Molecular genotyping in brazilian patients with the classical and nonclassical forms of 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;83:4416-4419.
78. Azziz R, Dewailly D, Owerbach D. Clinical review 56: Nonclassic adrenal hyperplasia: current concepts. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;78(4):810-815.
79. Bachega TA, Brenha EM, Billerbeck AE, Marcondes JA, Madureira G, Arnhold IJ, Mendonca BB. Variable ACTH-stimulated 17-hydroxyprogesterone values in 21-hydroxylase deficiency carriers are not related to the different CYP21 gene mutations. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87(2):786-790.

80. Rumsby G, Avey CJ, Conway GS, Honour JW. Genotype-phenotype analysis in late onset 21-hydroxylase deficiency in comparison to the classical forms. *Clin Endocrinol* 1998;48:707-711.
81. Concolino P, Mello E, Zuppi C, Capoluongo E. Molecular diagnosis of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency: an update of new CYP21A2 mutations. *Clin Chem Lab Med* 2010;48(8):1057-1062.
82. White PC, Speiser PW. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Endocr Rev* 2000;21:245-291.
83. Forest MG. Recent advances in the diagnosis and management of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Hum Reprod Update* 2004;10(6):469-485.
84. The Human Cytochrome P450(CAP) Allele Nomenclature Database. Dostupno na [www.cypalleles.ki.se/cyp21.htm](http://www.cypalleles.ki.se/cyp21.htm) (zadnji pristup 21.03.2014).
85. Deneux C, Tardy V, Dib A, Mornet E, Billaud L, Charron D, Morel Y, Kuttenn F. Phenotype-genotype correlation in 56 women with nonclassical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:207-213.
86. Werkmeister JW, New MI, Dupont B, White PC. Frequent deletion and duplication of the steroid 21-hydroxylase genes. *Am J Hum Genet* 1986;39(4):461-469.
87. Garlepp MJ, Wilton AN, Dawkins RL, White PC. Rearrangement of 21-hydroxylase genes in disease-associated MHC supratypes. *Immunogenetics* 1986;23(2):100-105.
88. Araújo RS, Mendonca BB, Barbosa AS, Lin CJ, Marcondes JA, Billerbeck AE, Bachega TA. Microconversion between CYP21A2 and CYP21A1P promoter regions causes the nonclassical form of 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92(10):4028-4034.
89. Wedell A, Thilen A, Ritzen EM, Stengler B, Luthman H. Mutational spectrum of the steroid 21-hydroxylase gene in Sweden: implications for genetic diagnosis and association with disease manifestation. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;78:1145-1152.
90. White PC, Vitek A, Dupont B, New MI. Characterization of frequent deletions causing steroid 21-hydroxylase deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85(12):4436-4440.
91. Rodrigues NR, Dunham I, Yu CY, Carroll MC, Porter RR, Campbell RD. Molecular characterization of the HLA-linked steroid 21-hydroxylase B gene from an individual with congenital adrenal hyperplasia. *EMBO J* 1987;6(6):1653-1661.
92. Higashi Y, Hiromasa T, Tanae A, Miki T, Nakura J, Kondo T, Ohura T, Ogawa E, Nakayama K, Fujii-Kuriyama Y. Effects of individual mutations in the P-450(c21)



- pseudogene on the P-450(C21) activity and their distribution in the patient genomes of congenital steroid 21-hydroxylase deficiency. *J Biochem* 1991;109(4):638-644.
93. Higashi Y, Tanae A, Inoue H, Fujii-Kuriyama Y. Evidence for frequent gene conversion in the steroid 21-hydroxylase P-450(C21) gene: implications for steroid 21-hydroxylase deficiency. *Am J Hum Genet* 1988;42(1):17-25.
  94. Amor M, Parker KL, Globberman H, New MI, White PC. Mutation in the CYP21B gene (Ile-172---Asn) causes steroid 21-hydroxylase deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85(5):1600-1604.
  95. Tusie-Luna MT, Traktman P, White PC. Determination of functional effects of mutations in the steroid 21-hydroxylase gene (CYP21) using recombinant vaccinia virus. *J Biol Chem* 1990;265(34):20916-20922.
  96. Globberman H, Amor M, Parker KL, New MI, White PC. Nonsense mutation causing steroid 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Invest* 1988;82(1):139-144.
  97. Chiou SH, Hu MC, Chung BC. A missense mutation at Ile172---Asn or Arg356---Trp causes steroid 21-hydroxylase deficiency. *J Biol Chem* 1990;265(6):3549-3552.
  98. Owerbach D, Sherman L, Ballard AL, Azziz R. Pro-453 to Ser mutation in CYP21 is associated with nonclassical steroid 21-hydroxylase deficiency. *Mol Endocrinol* 1992;6:1211-1215.
  99. Nikoshkov A, Lajic S, Holst M, Wedell A, Luthman H. Synergistic effect of partially inactivating mutations in steroid 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82(1):194-199.
  100. Dracopoulou-Vabouli M, Maniati-Christidi M, Dacou-Voutetakis C. The spectrum of molecular defects of the CYP21 gene in the Hellenic population. Variable concordance between genotype and phenotype in the different forms of congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:2845-2848.
  101. Balsamo A, Cacciari E, Baldazzi L, Tartaglia L, Cassio A, Mantovani V, Piazzzi S, Cicognani A, Pirazzoli P, Mainetti B, Zappulla F. CYP21 analysis and phenotype/genotype relationship in the screened population of the Italian Emilia-Romagna region. *Clin Endocrinol* 2000;53:117-125.
  102. Lobato NM, Ordoñez- Sanchez MI, Tusie-Luna MT, Meseguer A. Mutation analysis in patients with congenital adrenal hyperplasia in the Spanish population: identification of putative novel steroid 21-hydroxylase deficiency alleles associated with the classic form of the disease. *Hum Hered* 1999;49:169-175.

103. Dolzan V, Sólyom J, Fekete G, Kovács J, Rakosnikova V, Votava F, Lebl J, Pribilincova Z, Baumgartner-Parzer SM, Riedl S, Waldhauser F, Frisch H, Stopar-Obreza M, Krzisnik C, Battelino T. Mutational spectrum of steroid 21-hydroxylase and the genotype-phenotype association in Middle European patients with congenital adrenal hyperplasia. *Eur J Endocrinol* 2005;153(1):99-106.
104. Ordoñez- Sanchez MI, Ramírez-Jiménez S, López-Gutierrez AU, Riba L, Gamboa-Cardiel, Cerrillo-Hinojosa M, Altamirano-Bustamante N, Calzada-Leon R, Robles-valdes C, Mendoza-Morfin M, Tusie-Luna MT. Molecular genetic analysis of patients carrying steroid 21-hydroxylase deficiency in the Mexican population: identification of possible new mutation and high prevalence of apparent germ-line mutations. *Hum Genet* 1998;102:170-177.
105. Tajima T, Fujieda K, Nakae J, Toyoura T, Shimozawa K, Kusuda S, Goji K, Nagashima T, Cutler Jr GB. Molecular basis of nonclassical 21-hydroxylase deficiency detected by neonatal mass screening in Japan. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;82:2350-2356.
106. Dolzan V, Stopar-Obreza M, Zerjav-Tansek M, Breskvar K, Krzisnik C, Battelino T. Mutational spectrum of congenital adrenal hyperplasia in Slovenian patients: a novel Ala15Thr mutation and Pro30Leu within a larger gene conversion associated with a severe form of the disease. *Eur J Endocrinol* 2003;149(2):137-144.
107. Avivi I, Pollack S, Gideoni O, Linn S, Blumenfeld Z. Overdiagnosis of 21-hydroxylase late onset congenital adrenal hyperplasia: correlation of corticotropin test and human leukocyte antigen typing. *Fertil Steril* 1996;66:557-563.
108. Nimkarn S, Cerame BI, Wie J, Dumic M, Žunec R, Brkljačić LJ, Škrabić V, New MI, Wilson RC. Congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency) without demonstrable genetic mutations. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:378-381.
109. Arajuo RS, Billerbeck AE, Madureira G, Mendonca BB, Bachega TA. Substitutions in the CYP21A2 promoter explain the simple-virilizing form of 21-hydroxylase deficiency in patients harbouring a P30L mutation. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2005; 62:132-136.
110. O'Neill GJ, Dupont B, Pollack MS, Levine LS, New MI. Complement C4 allotypes in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency: further evidence for different allelic variants at the 21-hydroxylase locus. *Clin Immunol Immunopathol* 1982;23(2):312-322.
111. Dupont B, Oberfield SE, Smithwick EM, Lee TD, Levine LS. Close genetic linkage between HLA and congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency). *Lancet* 1977;2(8052-8053):1309-1312.

112. Wedell A. Molecular genetics of congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency): implications for diagnosis, prognosis and treatment. *Acta Paediatr* 1988; 87:159-164.
113. Bormann M, Kochhan L, Knorr D, Bidlingmaier F, Olek K. Clinical heterogeneity of 21-hydroxylase deficiency of sibs with identical 21-hydroxylase genes. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1992;126:7-9.
114. Krone N, Braun A, Roscher AA, Knorr D, Schwartz HP. Predicting phenotype in steroid 21-hydroxylase deficiency? Comprehensive genotyping in 155 unrelated, well defined patients from Southern Germany. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:1059-1065.
115. Baumgartner-Parzer SM, Schulze E, Waldhäusl W, Pauschenwei S, Rondot S, Nowotny P, Meyer K, Frisch H, Waldhauser F, Vierhapper H. Mutational spectrum of the steroid 21-hydroxylase gene in Austria: identification of a novel missense mutation. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:4771-4775.
116. Janjanin N, Dumic M, Skrabic V, Kusec V, Grubic Z, Spehar Uroic A. Five patients with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency (one with associated neuroblastoma) discovered in three generations of one family. *Horm Res* 2007;67(3):111-116.
117. L'Allemand D, Tardy V, Grüters A, Schnabel D, Krude H, Morel Y. How a patient homozygous for a 30-kb deletion of the C4-CYP21 genomic region can have a nonclassic form of 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85(12):4562-4567.
118. Arajao RD, Billerbeck AE, Madureira G, Mendonca BB, Bachega TA. Substitution in the CYP21A2 promoter explain the simple-virilizing form of 21-hydroxylase deficiency in patients harbouring a P30L mutation. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2005;62(2):132-136.
119. Arajao RS, Mendonca BB, Barbosa AS, Lin CJ, Marcondes JA, Billerbeck AE, Bachega TA. Microconversion between CYP21A2 and CYP21A1P promoter regions causes the nonclassical form of 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92(10):4028-4034.
120. Zhou Z, Agarwal VR, Dixit N, White PC, Speiser PW. Steroid 21-hydroxylase expression and activity in human lymphocytes. *Mol Cell Endocrinol* 1997;127:11-18.
121. Vottero A, Capelletti M, Giuliodori S, Viani I, Ziveri M, Neri TM, Bernasconi S, Ghizzoni L. Decreased androgen receptor gene methylation in premature pubarche: a novel pathogenetic mechanism? *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91(3):968-972.

122. New MI, Carlson A, Obeid J, Marshall I, Cabrera MS, Goseco A, Lin-Su K, Putnam AS, Wei JQ, Wilson RC. Prenatal diagnosis for congenital adrenal hyperplasia in 532 pregnancies. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(12):5651-5657.
123. Witchel SF, Miller WL. Prenatal treatment of congenital adrenal hyperplasia – not standard of care. *J Genet Couns* 2012;21(5):615-624.
124. Speiser PW, Azziz R, Baskin LS, Ghizzoni L, Hensle TW, Merke DP, Meyer-Bahlburg HF, Miller WL, Montori VM, Oberfield SE, Ritzen M, White PC; Endocrine Society. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95(9):4133-4160.
125. Kastelan A, Brkljacić-Surkalović L, Dumić M. The HLA associations in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency in a Yugoslav population. *Ann N Y Acad Sci* 1985;458:36-40.
126. Dumić M, Brkljacić L, Speiser PW, Wood E, Crawford C, Plavšić V, Banicević M, Radmanović S, Radica A, Kastelan A, New MI. An update on the frequency of nonclassic deficiency of adrenal 21-hydroxylase in the Yugoslav population. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1990;122:703-710.
127. Grubić Z, Zunec R, Cecuk-Jelčić E, Kerhin-Brkljacić V, Kastelan A. Polymorphism of HLA-A, -B, -DRB1, -DQA1 and -DQB1 haplotypes in a Croatian population. *Eur J Immunogenet* 2000;27(1):47-51.
128. Baumgartner-Parzer SM, Nowotny P, Heinze G, Waldhäusl W, Vierhapper H. Carrier frequency of congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency) in a middle European population. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90(2):775-778.
129. Peter M, Sippel WG, Lorenzen F, Willig RP, Westphal E, Grosse-Wilde J. Improved test to identify heterozygotes for congenital adrenal hyperplasia without index case examination. *Lancet* 1990;335(8701):1296-1299.
130. Wilson RC, Mercado AB, Cheng KC, New MI. Steroid 21-hydroxylase deficiency: genotype may not predict phenotype. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:2322-2329.
131. Paris F, Tardy V, Chalancon A, Picot MC, Morel Y, Sultan C. Premature pubarche in Mediterranean girls: high prevalence of heterozygous CYP21 mutation carriers. *Gynecol Endocrinol* 2010;26(5):319-324.
132. Keleştimur F, Everest H, Dundar M, Tanrıverdi F, White C, Witchel SF. The frequency of CYP21 gene mutations in Turkish women with hyperandrogenism. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2009;117(5):205-208.
133. Witchel SF, Aston CE. The role of heterozygosity for CYP21 in the polycystic ovary syndrome. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2000;13(Suppl5):1315-1317.

134. Escobar-Morreale HF, San Millan JL, Smith RR, Sancho J, Witchel SF. The presence of the 21-hydroxylase deficiency carrier status in hirsute women: phenotype-genotype correlations. *Fertil Steril* 1999;72(4):629-638.
135. Azziz R, Owerbach D. Molecular abnormalities of the 21-hydroxylase gene in hyperandrogenic women with an exaggerated 17-hydroxyprogesterone response to short-term adrenal stimulation. *Am J Obstet Gynecol* 1995;172(3):914-918.
136. Witchel SF, Kahsar-Miller M, Aston CE, White C, Azziz R. Prevalence of CYP21 mutations and IRS1 variant among women with polycystic ovary syndrome and adrenal androgen excess. *Fertil Steril* 2005;83(2):371-375.
137. Baumgartner-Parzer SM, Pauschenwein S, Waldhäusl W, Pölzler K, Nowotny P, Vierhapper H. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2002;56(6):811-816.
138. Ferriman D, Gallwey JD. Clinical assessment of body hair growth in women. *J Clin Endocrinol Metab* 1961;21:1440-1448.
139. Hatch R, Rosenfield RL, Kim MH, Tredway D. Hirsutismus: implications, etiology and management. *Am J Obstet Gynecol* 1981;140(7):815-830.
140. Greulich WW, Pyle SI. *Radiographic Atlas of Skeletal Development of the Hand and Wrist*. Stanford, Stanford University Press, 1959.
141. Terasaki PI, McClelland JD. Microdroplet assay of human serum cytotoxins. *Nature* 1964;204:998-1000.
142. Danilovs JA, Ayoub G, Terasaki PI. B-lymphocyte isolation by thrombin-nylon wool. In: Terasaki PI, ed. *Histocompatibility testing* 1980. Los Angeles: UCLA Tissue Typing Laboratory, 1981;287-288.
143. Olerup O, Zetterquist H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens* 1992;39(5):225-235.
144. Veček N, Veček A, Zajc Petranović M, Tomas Z, Arch-Veček B, Škarić-Jurić T, Miličić J. Secular trend of menarche in Zagreb (Croatia) adolescents. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2012;160(1):51-54.
145. Ezquieta B, Cueva E, Varela J, Oliver A, Fernandez J, Jariego C. Non-classical 21-hydroxylase deficiency in children – association of adrenocorticotrophic hormone-stimulated 17-hydroxyprogesterone with the risk of compound heterozygosity with severe mutations. *Acta Paediatr* 2002;91(8):892-898.

146. Einaudi S, Napolitano E, Restivo F, Motta G, Baldi M, Tuli G, Grosso E, Migone N, Menegatti E, Manieri C. Genotype, phenotype and hormonal levels correlation in non-classical congenital adrenal hyperplasia. *J Endocrinol Invest* 2011;34(9):660-664.
147. Finkelstein GP, Kim MS, Sinaii N, Nishitani M, Van Ryzin C, Hill SC, Reynolds JC, Hanna RM, Merke DP. Clinical characteristics of a cohort of 244 patients with congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97(12):4429-4438.
148. Moura-Massari VO, Bugano DD, Marcondes JA, Gomes LG, Mendonca BB, Bachega TA. CYP21A2 genotypes do not predict the severity of hyperandrogenic manifestations in the nonclassical form of congenital adrenal hyperplasia. *Horm Metab Res* 2013;45(4):301-307.
149. Thankamony A, Ong KK, Ahmed ML, Ness AR, Holly JM, Dunger DB. Higher levels of IGF-I and adrenal androgens at age 8 years are associated with earlier age at menarche in girls. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97(5):E786-790.
150. Therrell BL, Berenbaum SA, Manter-Kapanke V, Simmank J, Korman K, Prentice L, Gonzalez J, Gunn S. Results of screening 1.9 million Texas newborns for 21-hydroxylase-deficient congenital adrenal hyperplasia. *Pediatrics* 1998;101(4Pt1):583-590.
151. Roitman A, Stivel M, Zamir R, Kaufman H, Pertzalan A, Laron Z. Late-onset type of 21-hydroxylase deficiency in childhood. *Isr J Med Sci* 1982;18(7):763-768.
152. Napolitano E, Manieri C, Restivo F, Composto E, Lanfranco F, Repici M, Pasini B, Einaudi S, Menegatti E. Correlation between genotype and hormonal levels in heterozygous mutation carriers and non-carriers of 21-hydroxylase deficiency. *J Endocrinol Invest* 2011;34(7):498-501.
153. Escobar-Morreale HF, Sanchon R, San Millan JL. A prospective study of the prevalence of nonclassical congenital adrenal hyperplasia among women presenting with hyperandrogenic symptoms and signs. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93(2):527-533.
154. Pollack MS, Levine LS, O'Neill GJ, Pang S, Lorenzen F, Kohn B, Rondoni GF, Chiumello G, New MI, Dupont B. HLA linkage and B\*14, DR1, B\*57 haplotype association with the genes for late onset and cryptic 21-hydroxylase deficiency. *Am J Hum Genet* 1981;33(4):540-550.
155. White PC, Grossberger D, Onufer BJ, Chaplin DD, New MI, Dupont B, Strominger JL. Two genes encoding steroid 21-hydroxylase are located near the genes encoding the fourth component of complement in man. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82(4):1089-1093.

156. Higashi Y, Tanae A, Inoue H, Hiromasa T, Fujii-Kuriyama Y. Aberrant splicing and missense mutations cause 21-hydroxylase (P-450(C21)) deficiency in humans: possible gene conversion products. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85(20):7486-7490.
157. Ferenczi A, Garami M, Kiss E, Pek M, Sasvari-Szekely M, Barta C, Staub M, Solyom J, Fekete G. Screening for mutations of 21-hydroxylase gene in Hungarian patients with congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84(7):2369-2372.
158. Wedell A, Ritzen EM, Haglund-Stengler B, Luthman H. Steroid 21-hydroxylase deficiency: three additional mutated alleles and establishment of phenotype-genotype relationships of common mutations. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89(15):7232-7236.
159. Admoni O, Israel S, Lavi I, Gur M, Tenenbaum-Rakover Y. Hyperandrogenism in carriers of CYP21 mutations: the role of genotype. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006;64(6):645-651.
160. London DR. The consequences of hyperandrogenism in young women. *J R Soc Med* 1987;80(12):741-745.
161. Levine LS; Dupont B, Lorenzen F, Pang S, Pollack M, Oberfield S, Kohn B, Lerner A, Cacciari E, Mantero F, Cassio A, Scaroni C, Chiumello G, Rondanini GF, Gargantini L, Giovannelli G, Virdis R, Bartolotta E, Migliori C, Pintor C, Tato L, Barboni F, New MI. Cryptic 21-hydroxylase deficiency in families of patients with classical congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 1980;51(6):1316-1324.
162. Kohn B, Levine LS, Pollack MS, Pang S, Lorenzen F, Levy D, Lerner AJ, Rondanini GF, Dupont B, New MI. Late-onset steroid 21-hydroxylase deficiency: a variant of classical congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 1982;55(5):817-827.
163. Moran C, Azziz R, Weintrob N, Witchel SF, Rohmer V, Dewailly D, Marcondes JA, Pugeat M, Speiser PW, Pignatelli D, Mendonca BB, Bachega TA, Escobar-Morreale HF, Carmina E, Fruzzetti F, Kelestimur F. Reproductive outcome of women with 21-hydroxylase-deficient nonclassic adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91(9):3451-3456.
164. Augarten A, Weissenberg R, Pariente C, Sack J. Reversible male infertility in late onset congenital adrenal hyperplasia. *J Endocrinol Invest* 1991;14(3):237-240.
165. Cabrera MS, Vogiatzi MG, New MI. Long term outcome in adult males with classic congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(7):3070-3078.
166. Stikkelbroeck NM, Otten BJ, Pasic A, Jager GJ, Sweep CG, Noordam K, Hermus AR. High prevalence of testicular adrenal rest tumors, impaired spermatogenesis, and Leydig

cell failure in adolescent and adult males with congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(12):5721-6728.

167. Hagenfeldt K, Janson PO, Holmdahl G, Falhammar H, Filipsson H, Frisen L, Thoren M, Nordenskjöld A. Fertility and pregnancy outcome in women with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Hum Reprod* 2008;23(7):1607-1613.
168. Pang SY, Wallace MA, Hofman L, Thuline HC, Dorche C, Lyon IC, Dobbins RH, Kling S, Fujieda K, Suwa S. Worldwide experience in newborn screening for classical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Pediatrics* 1988;81(6):866-874.



# 10. ŽIVOTOPIS

**Ime i prezime:** Nevena Krnić (Janjanin), spec. pedijatar

**Datum i mjesto rođenja:** 9.07.1976 u Ogulinu, Hrvatska

**Obrazovanje:**

Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 1994-2000.

Specijalist pedijatar 2004-2009.

Uža specijalizacija iz pedijatrijske endokrinologije, dijabetesa i bolesti metabolizma  
2014. -

**Radno iskustvo:**

Znanstveni novak, Katedra za pedijatriju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu,  
2001-2004.

Zavod za hematologiju i onkologiju, Klinika za pedijatriju 2010-2012.

Zavod za endokrinologiju, Klinika za pedijatriju 2012.-

**Popis znanstvenih radova:**

6 znanstvenih radova u CC indeksiranim publikacijama

- Dumic K, Krnić N, Skrabić V, Stipančić G, Cvijović K, Kusec V, Stingl K. Classical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency in Croatia between 1995 and 2006. Horm Res 2009;72(5):310-4.
- Dumic M, Radman I, Krnić N, Nola M, Kusec R, Begović D, Labar B, Rados M. Successful treatment of diffuse large B-cell non-hodgkin lymphoma with modified CHOP (cyclophosphamide/doxorubicin/vincristine/prednisone) chemotherapy and rituximab in a patient with Nijmegen syndrome. Clin Lymphoma Myeloma 2007;7(9):590-3.
- Janjanin N, Dumic M, Skrabić V, Kusec V, Grubić Z, Spehar Uroic A. Five patients with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency (one with associated neuroblastoma) discovered in three generations of one family. Horm Res. 2007;67(3):111-6.

- Dumic M, Janjanin N, Ille J, Zunec R, Spehar A, Zlopasa G, Francetic I, New MI. Pregnancy outcomes in women with classical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. J Pediatr Endocrinol Metab. 2005 Sep;18(9):887-95.
- Dumic M, Ille J, Zunec R, Plavsic V, Francetic I, Skrabic V, Janjanin N, Spehar A, Wei J, Wilson RC, New MI. Nonclassic 21-hydroxylase deficiency in Croatia. J Pediatr Endocrinol Metab. 2004 Feb;17(2):157-64.
- Dumic M, Simunic V, Ilic-Forko J, Cvitanovic M, Plavsic V, Janjanin N, Ille J. Extraovarian steroid cell tumor 'not otherwise specified' as a rare cause of virilization in twelve-year-old girl. Horm Res. 2001;55(5):254-7.

6 znanstvenih radova u drugim indeksnim bazama

5 sažetaka u CC indeksiranim publikacijama

#### **Ostalo:**

Aktivno sudjelovanje na brojnim međunarodnim i domaćim znanstvenim skupovima 2001. –